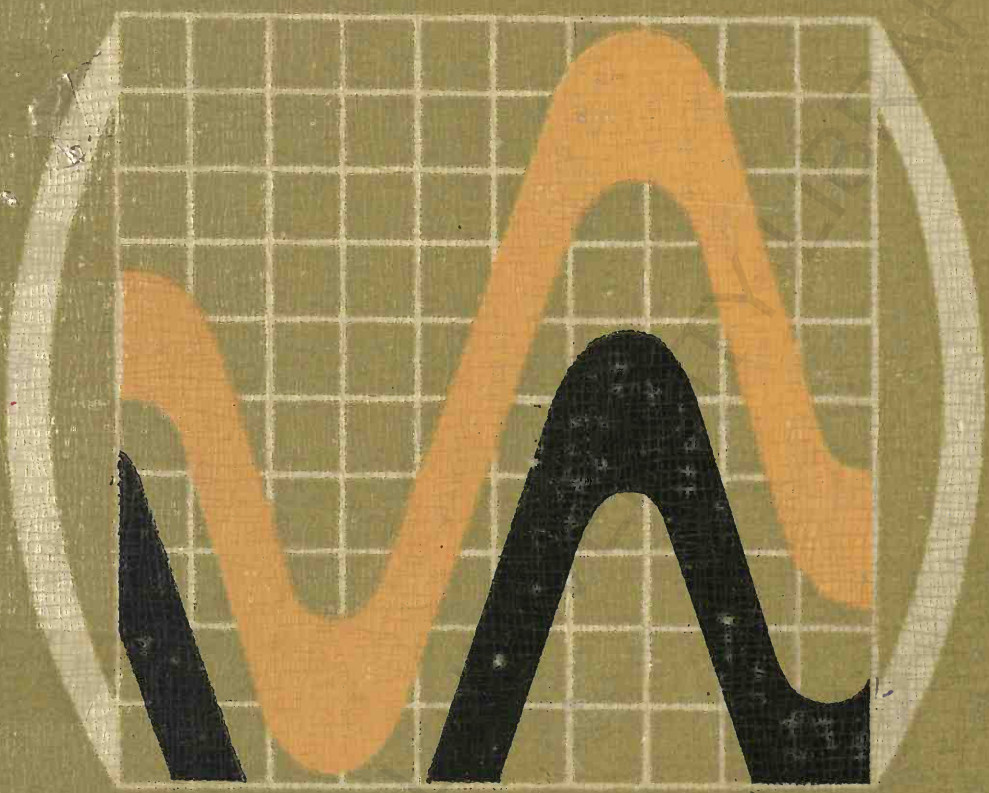
I. F. DUMITRU



BIOCHIMIE

EDITURA DIDACTICĂ ȘI PEDAGOGICĂ
BUCUREȘTI — 1980

BIBL. CENTR. UNIV.
„M. EMINESCU" IAȘI
III 169570

BCU IAȘI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

523648

MINISTERUL EDUCAȚIEI ȘI ÎNVĂȚĂMÎNTULUI

UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI

I. F. DUMITRU

Prof. dr. doc. șt.

IOCHIMIE

TURA DIDACTICA ȘI PEDAGOGICĂ, BUCUREȘTI — 1980

BCU IAȘI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Referent : conf. dr. VLAD ARTENIE — Universitatea Iași

acu 523648

Tehnoredactor: VERGILIA RUSU
Grafician: NICOLAE SÎRBU

BCU IAȘI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CUVÎNT ÎNAINTE

Lucrarea de față reprezintă o încercare de a trata problematica actuală a biochimiei plecînd de la strînsa corelație dintre structura și funcția constituenților celulari. Cititorul poate fi surprins de modul în care diferite categorii de substanțe sînt reunite în același capitol, pe baza înrudirii lor structurale, sau de faptul că în cuprinsul lucrării unele capitole tradiționale *ale biochimiei au fost tratate mai concis sau au fost* omise *prin repartizarea problematicii în virtutea principiului enunțat mai sus. Surprinderea lui va fi sporită de abordarea comparată a unor aspecte biologice și biochimice, de abordarea unor probleme a căror elucidare ar necesita dovezi experimentale suplimentare, precum și de terminologia și prescurtările utilizate.*

Încercarea de a reda într-o formă concisă materialul faptic deosebit de bogat, acumulat în ultimii 15—20 ani în diferite laboratoare, institute și centre de cercetări biochimice, a fost dublată de efortul de a pune la îndemîna cititorului un aparat bibliografic adecvat, bazat, îndeosebi, pe lucrări devenite clasice sau pe lucrări experimentale de dată recentă care deschid noi perspective cercetării sau oferă posibilitatea unei interpretări integrative a proceselor biologice și biochimice.

Aprecierea gradului în care lucrarea de față oglindește cuceririle biochimiei contemporane, aplicațiile ei practice în cele mai diferite domenii și perspectivele dezvoltării viitoare rămîne la latitudinea cititorilor.

Exprimăm gratitudinea noastră prof. Hoffman-Ostenhof, președintele Comisiei Internaționale de Biochimie (IUB) pentru nomenclatura biochimică, prof. E. C. Slater, trezorier al IUB, prof. Harold Thompson, președintele IUPAC și Dr. M. Williams, secretar executiv al IUPAC, dr. E. Cohn, secretar al Comisiei IUB-IUPAC pentru nomenclatură biochimică, editurilor Elsevier, Excerpta-Medica, North-Holland și Blackwell Scientific Publication LTD, care ne-au furnizat numeroase lucrări privind nomenclatura biochimică recomandă de IUB-IUPAC sau ne-au acordat cu colegialitate și amabilitate permisiunea de a reproduce în lucrarea de față unele reguli, diagrame și planșe. Exprimăm, de asemenea, mulțumirile noastre tuturor colegilor care au citit manuscrisul în cursul elaborării lui și ne-au sugerat idei prețioase.

Rămînem anticipat recunoscători tuturor persoanelor, care după lectura acestei lucrări ne vor comunica opinia lor.

I. F. DUMITRU

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CUPRINS

1. AMINOACIZII – UNITĂȚILE STRUCTURALE ALE PROTEINELOR . . . 21

1. Aminoacizii . . . 22
1.1 Aminoacizi aciclici sau alifatici . . . 22
1.1.1 Acizii monoaminomonocarboxilici . . . 22
1.1.2 Acizii monoaminodicarboxilici . . . 31
1.1.3 Acizii diaminomonocarboxilici . . . 31
1.2 Aminoacizi ciclici . . . 34
1.2.1 Aminoacizi aromatici . . . 34
1.3 Aminoacizi heterociclici . . . 34
1.4 Proprietăți generale ale aminoacizilor . . . 39
1.4.1 Proprietăți fizice . . . 39
1.4.2 Proprietăți chimice . . . 49
1.4.2.1 Reacții ale grupării carboxil . . . 49
1.4.2.2 Reacții ale grupării amino . . . 51
1.5 Determinarea calitativă și cantitativă a aminoacizilor . . . 56

2. PEPTIDE NATURALE ȘI DE SINTEZĂ – STRUCTURĂ, PROPRIETĂȚI ȘI FUNCȚII . . . 61

2.1 Sinteza peptidelor . . . 62
2.2 Peptide naturale și substanțe înrudite lor . . . 67
2.2.1 Dipeptide . . . 67
2.2.2 Tripeptide . . . 68
2.2.3 Polipeptide . . . 71
2.2.3.1 Polipeptide naturale liniare alcătuite din *L*-aminoacizi . . . 71
2.2.3.2 Polipeptide naturale ciclice alcătuite din *L*-aminoacizi . . . 90
2.2.3.3 Polipeptide naturale liniare alcătuite din *L*- și *D*-aminoacizi . . 93
2.2.3.4 Polipeptide ciclice alcătuite din *L*- și *D*-aminoacizi . . . 94
2.2.3.5 Depsipeptide ciclice . . . 96
2.2.3.6 Alte polipeptide cu activitate biologică . . . 98

3. PROTEINE. CLASIFICARE. CONFORMAȚIE MOLECULARĂ, METODE DE ANALIZĂ . . . 101

3.1 Separarea, purificarea și caracterizarea fizico-chimică a proteinelor . . . 105
3.1.1 Separarea și purificarea proteinelor . . . 105
3.1.2 Verificarea purității proteinelor . . . 108

3.1.3 Compoziție și structură 109
3.1.4 Determinarea masei moleculare 110
3.2 Hidroliza proteinelor și peptidelor naturale 114
3.2.1 Hidroliza acidă a peptidelor și proteinelor 114
3.2.2 Hidroliza proteinelor cu bromcian sau cu iodacetamidă 115
3.2.3 Hidroliza secvențială sau succesivă a proteinelor începînd de la extremitatea $-NH_2$-terminală 116
3.2.4 Hidroliza secvențială a proteinelor începînd de la extremitatea — COOH -terminală 116
3.2.5 Hidrazinoliza 117
3.2.6 Hidroliza enzimatică nespecifică 118
3.2.7 Hidroliza enzimatică la *p*H acid 119
3.2.8 Hidroliza enzimatică la temperaturi moderate 119
3.2.9 Hidroliza enzimatică specifică 119
3.2.10 Hidroliza cu enzime insolubilizate 120
3.3 Conformația proteinelor 121
3.3.1 Structura primară a proteinelor 122
3.3.2 Structura secundară a proteinelor 131
3.3.3 Structura terțiară a proteinelor 138
3.3.4 Structura cuaternară a proteinelor 141
3.3.5 Corelații între nivelele de organizare ale structurii proteinelor 144
3.3.6 Metode de investigare a structurilor secundare și terțiare ale moleculelor proteice 146

4. CROMOPROTEIDE 153

4.1 Cromoproteide porfirinice 153
4.1.1 Hemoglobinele 153
4.1.2 Mioglobina 163
4.1.3 Cloroplastinele 164
4.1.4 Citocromii 170

5. NUCLEOPROTEIDE. NUCLEOZIDE. NUCLEOTIDE. POLINUCLEOTIDE. ACIZII NUCLEICI 179

5.1 Acizii nucleici 180
5.1.1 Baze azotate purinice și pirimidinice 181
5.1.2 Nucleozide 185
5.1.3 Alte nucleozide naturale 186
5.1.4 Nucleotide 190
5.1.5 Acizii ribonucleici (RNA) 193
5.1.5.1 Acidul ribonucleic mesager (*m*RNA) 202
5.1.5.2 Acizii ribonucleici de transfer (*t*RNA) 204
5.1.5.3 Acizii ribonucleici ribozomali (*r*RNA) 212
5.1.6 Acidul deoxiribonucleic (DNA) 218

6. ENZIME 233

6.1 Scurt istoric 233
6.2 Noțiuni generale 236
6.3 Nomenclatura și clasificarea enzimelor 239
6.4 Centrul activ al enzimei 248
6.5 Structura enzimelor 256

6.5.1 Zimogene și inhibitori naturali 261
6.5.2 Inhibitori proteici ai enzimelor proteolitice 267
6.6 Cinetica enzimatică 271
6.7 Enzime alosterice 282
6.8 Utilizările practice ale enzimelor 286

7. ALTE PROTEINE FUNCȚIONALE 289

7.1 Glicoproteine 289
7.1.1 Ceruloplasmina 292
7.1.2 Transferinele 293
7.1.3 Fetuina 294
7.1.4 α_2-Macroglobulinele 296
7.1.5 Haptoglobulinele 297
7.1.6 Glicoprotide cu activitate hormonală 298
7.1.7 Tiroglobulina 303
7.2 Lipoproteine 304
7.2.1 α-Lipoproteinele 305
7.2.2 β-Lipoproteinele 305
7.3 Fosfoproteinele 306
7.4 Metaloproteinele 307
7.4.1 Feritina 307
7.4.2 Hemosiderina 308
7.4.3 Conalbumina 308
7.4.4 Hemeritrina 308
7.5 Metaloenzimele 309
7.5.1 Xantinoxidaza 311
7.5.2 Amilazele 311
7.5.3 Enolaza 312
7.5.4 Catalaza 312
7.5.5 Carbonic anhidraza 313

8. COENZIME ȘI COFACTORI ENZIMATICI 315

8.1 Coenzime de natură alifatică 316
8.1.1 Acidul lipoic 316
8.1.2 Glutationul 318
8.1.3 Acidul ascorbic 319
8.2 Coenzime de natură aromatică 321
8.3 Coenzime de natură heterociclică 321
8.3.1 Coenzime — derivați ai tiaminei, vitaminei B_1 sau ancurinei 321
8.3.2 Coenzime derivate de la biotină 325
8.3.3 Coenzime derivate de la piridoxină 332
8.3.4 Coenzime derivate de la acidul folic 338
8.3.5 Coenzime derivate de la nucleozide 348
8.3.5.1 Adenozintrifosfații 349
8.3.5.2 Guanozinfosfații 353
8.3.5.3 Citidinfosfații 353
8.3.5.4 Coenzima *A* 353
8.3.5.5 Coenzimele nicotinamidnucleotidice 357

BCU IAȘI

8.3.5.6 Coenzimele flavinice 361
8.3.5.7 Coenzimele cobamidice 368
8.3.5.8 Coenzime și cofactori feroporfirinici 371
8.3.5.9 Feredoxinele 375

9. ZAHARIDE (GLUCIDE) 377

9.1 Monozaharide 377
9.1.1 Trioze 378
9.1.2 Aldotetroze 378
9.1.3 Aldopentoze 378
9.1.4 Cetopentoze 379
9.1.5 Ceto- și aldohexoze 380
9.1.6 Ceto- și aldoheptoze 382
9.2 Oligozaharide sau oligoglucide 384
9.2.1 Dizaharide 385
9.2.2 Trizaharide 391
9.2.3 Tetrazaharide 393
9.3 Polizaharide 394
9.3.1 Homopolizaharide 395
9.3.2 Heteropolizaharide sau heteropolioze 406
9.3.3 Polizaharidele bacteriene 413
9.3.4 Mucopolizaharide 414
9.3.5 Polizaharide cu sulf 417
9.4 Glicozide (Heterozide) 419

10. LIPIDE. ACIZI GRAȘI. LIPIDE SIMPLE. ETOLIDE 425

10.1 Acizii grași 426
10.1.1 Proprietăți fizico-chimice ale acizilor grași 431
10.2 Acilglicerolii sau grăsimile neutre 438
10.3 Prostaglandine 440
10.4 Ceride 443
10.5 Etolide 444

11. LIPIDE COMPLEXE, FOSFATIDE. GLICOLIPIDE 445

11.1 Fosfatide (Fosfolipide) 445
11.1.1 Glicerofosfolipide 446
11.1.2 Sfingofosfolipide (Fosfosfingozide) 449
11.1.3 Inozitolfosfolipide (Fosfoinozitide) 450
11.2 Glicolipide 452
11.3 Cerebrozide 455
11.4 Sulfolipide 460

12. STEROIZI. COMPUȘI IZOPRENICI ȘI IZOPRENOIDICI 463

12.1 Semiterpene 464
12.2 Monoterpene 465
12.3 Sesquiterpene 467
12.4 Diterpene 468
12.5 Gibberelline 468
12.6 Triterpene 471
12.7 Poliprenoli 471

12.8 Steroizi și lipide izoprenice 473
12.9 Sterolii 477
12.10 Acizi biliari 482
12.11 Vitaminele *D* 484
12.12 Hormonii steroizi 489
12.12.1 Hormonii sexuali 490
12.12.1.1 Hormoni androgeni (Hormoni sexuali masculini) 492
12.12.1.2 Hormoni estrogeni (Hormoni sexuali feminini) 494
12.12.1.3 Substanțe de sinteză cu acțiune estrogenă 497
12.12.1.4 Alți estrogeni 498
12.12.1.5 Hormoni gestageni 498
12.12.1.6 Substanțe de sinteză cu acțiune gestagenă 499
12.12.1.7 Hormonul gravidității 499
12.12.2 Hormoni corticosuprarenali 500
12.12.3 Hormonii glucocorticoizi 501
12.12.4 Hormoni mineralocorticoizi 502
12.12.5 Hormoni corticoizi de tip sexual 503
12.12.6 Analogi sintetici ai corticosteroizilor naturali 504
12.13 17-Cetosteroizii 504
12.14 Hormonii insectelor 506
12.15 Bufogenine 506
12.16 Politerpene 507
12.17 Carotenoizi 509
12.18 Tocoferolii și filochinonele 514
12.18.1 Vitaminele *E* sau tocoferolii 514
12.18.2 Vitaminele *K* sau filochinonele 517
12.19 Ubichinone 520

13. HORMONII ȘI MECANISMUL LOR DE ACȚIUNE 522

13.1 Noțiuni generale 522
13.2 Mecanismul de acțiune al hormonilor de natură peptidică și glicoproteică 534
13.3 Mecanismul de acțiune al hormonilor steroizi 537

14. METABOLISMUL GLUCIDELOR 544

14.1 Procese anabolice 544
14.1.1 Chemiosinteza 545
14.1.2 Fotosinteza 546
14.1.3 Biosinteza oligozaharidelor 558
14.1.4 Biosinteza polizaharidelor 561
14.1.4.1 Biosinteza amidonului 561
14.1.4.2 Biosinteza glicogenului 563
14.1.4.3 Dereglările metabolismului glicogenului 570
14.1.4.4 Biosinteza celulozei și pectinei 574
14.1.4.5 Biosinteza glicanilor la mamifere 575
14.1.4.6 Biosinteza peptidoglicanilor din peretele celular bacterian 578
14.1.4.7 Biosinteza exopolizaharidelor capsulare 582
14.1.4.8 Biosinteza determinanților „O" antigen 583
14.2 Degradarea oxidativă a glucidelor 584
14.2.1 Calea glicolitică, glicoliza sau calea metabolică Embden-Meyerhof-Parnas 585

14.2.2 Degradarea anaerobă a altor hexoze în cadrul procesului de glicoliză 597
14.2.3 Alte oze sau produşi ai metabolismului intermediar care pot fi degradaţi sau integraţi în glicoliză 600
14.2.4 Fermentaţia 601
14.2.5 Calea pentozofosfat 608
14.2.6 Calea Entner-Doudoroff 614
14.2.7 Calea acidului glucuronic 615
14.3 Unele dereglări ale metabolismului glucidic 619

15. CICLUL ACIZILOR TRICARBOXILICI 625

15.1 Bilanţul energetic al ciclului Krebs 635
15.2 Răspîndirea ciclului Krebs în lumea vie 636
15.3 Rolul ciclului Krebs în celulă 638
15.4 Ciclul acidului glioxilic 643
15.5 Ciclul acizilor glutamic-aspartic şi aspartic-glutamic 645
15.6 Controlul şi reglarea ciclului Krebs 646

16. OXIDĂRI CELULARE. FOSFORILAREA OXIDATIVĂ ŞI ACUMULAREA DE ENERGIE 648

16.1 Fosforilarea oxidativă 668
16.1.1 Fosforilarea oxidativă la nivelul substratului 668
16.1.2 Fosforilarea oxidativă la nivelul catenei respiratorii 669
16.1.3 Mecanismul fosforilării oxidative 671
16.2 Alte tipuri de oxidări biologice 674

17. METABOLISMUL ACIZILOR GRAŞI ŞI AL PROSTAGLANDINELOR 681

17.1 Biosinteza acizilor graşi 681
17.1.1 Sistemul citoplasmatic al sintezei acizilor graşi 681
17.1.2 Sistemul mitocondrial al sintezei acizilor graşi 689
17.1.3 Biosinteza acizilor graşi nesaturaţi 689
17.1.4 Biosinteza acizilor graşi cu catenă ramificată 694
17.2 Degradarea acizilor graşi liberi 695
17.2.1 Degradarea acizilor graşi prin mecanismul β-oxidării 695
17.2.2 Epimerizarea enzimatică a hidroxiacililor CoA 701
17.2.3 Ciclul Krebs şi β-oxidarea acizilor graşi 703
17.2.4 α-Oxidarea acizilor graşi 706
17.2.5 ω-Oxidarea acizilor graşi 707
17.3 Metabolismul şi acţiunea biologică a prostaglandinelor 710

18. METABOLISMUL COLESTEROLULUI, COMPUŞILOR IZOPRENOIDICI ŞI LIPIDELOR COMPLEXE 716

18.1 Biosinteza colesterolului 716
18.2 Catabolismul colesterolului 721
18.3 Metabolismul colesterolului şi hormonilor steroizi 724
18.4 Conjugarea şi excreţia corticosteroizilor 727
18.5 Biosinteza hormonilor estrogeni 729
18.6 Oxidarea microbiologică a steroizilor 729
18.7 Biosinteza gibberellinelor 733

18.8 Biosinteza cauciucului și gutapercii 735
18.9 Metabolismul vitaminelor *D* 735
18.10 Metabolismul carotenoizilor 741
18.11 Conversia carotenilor în vitamina *A* 744
18.12 Biosinteza lipidelor complexe 749
18.12.1 Sinteza fosfatidilcolinei și fosfatidiletanolaminei 749
18.12.2 Biosinteza fosfatidilserinei 751
18.12.3 Biosinteza inozitolfosfolipidelor 751
18.12.4 Biosinteza fosfatidilglicerolilor 752
18.12.5 Biosinteza sfingomielinelor și cerebrozidelor 752
18.12.6 Degradarea fosfolipidelor, sfingolipidelor și cerebrozidelor 756
18.13 Erori congenitale în metabolismul lipidelor 758
18.14 Factori care influențează metabolismul lipidelor 760

19. METABOLISMUL AMINOACIZILOR 767

19.1 Procese generale în metabolismul aminoacizilor 767
19.1.1 Dezaminarea aminoacizilor 767
19.1.2 Decarboxilarea aminoacizilor 769
19.1.3 Transaminarea aminoacizilor 770
19.1.4 Transamidinarea și transmetilarea aminoacizilor 770
19.2 Dereglările metabolismului aminoacizilor 771
19.3 Metabolismul principalilor aminoacizi neesențiali 772
19.3.1 Metabolismul glicocolului 772
19.3.2 Metabolismul alaninei 774
19.3.3 Metabolismul serinei 775
19.3.4 Metabolismul cisteinei 776
19.3.5 Metabolismul acidului aspartic și a amidei lui — asparagina 780
19.3.6 Metabolismul acidului glutamic și a amidei lui—glutamina 782
19.3.7 Metabolismul hidroxiprolinei 784
19.4 Metabolismul principalilor aminoacizi esențiali 786
19.4.1 Metabolismul lizinei 786
19.4.2 Metabolismul argininei și ornitinei 793
19.4.3 Metabolismul fenilalaninei și triptofanului 798
19.4.4 Metabolismul fenilalaninei 803
19.4.5 Metabolismul tirozinei în cadrul căilor catabolice 805
19.4.6 Metabolismul triptofanului 812
19.5 Metabolismul aminoacizilor alifatici lineari, ramificați și cu structură heterociclică 815
19.5.1 Metabolismul valinei 815
19.5.2 Metabolismul izoleucinei 816
19.5.3 Metabolismul leucinei 819
19.5.4 Metabolismul histidinei 819
19.6 Metabolismul amoniacului și sinteza ureei 822
19.7 Defecte ale metabolismului aminoacizilor din ciclul ureogenetic 826

20. METABOLISMUL MACROMOLECULELOR ACIZILOR NUCLEICI 827

20.1 Biosinteza ribo-mononucleotidelor 827
20.1.1 Biosinteza mononucleotidelor purinice 827
20.1.2 Reglarea biosintezei nucleotidelor purinice 831

20.1.3 Biosinteza mononucleotidelor pirimidinice 833
20.1.4 Reglarea biosintezei ribonucleotidelor pirimidinice 834
20.2 Biosinteza deoxiribonucleotidelor 835
21.2.1 Reglarea biosintezei deoxiribonucleotidelor 836
20.3 Biosinteza acidului deoxiribonucleic 837
20.4 Biosinteza acizilor ribonucleici 846
20.4.1 Biosinteza acidului ribonucleic mesager 846
20.4.2 Biosinteza acidului ribonucleic ribozomal 851
20.4.3 Biosinteza acidului ribonucleic de transport 852
20.4.4 Biosinteza RNA-RNA dependent 852
20.4.5 Sinteza de RNA cu polinucleotid fosforilază 853
20.5 Catabolismul acizilor nucleici 854

21. METABOLISMUL PROTEINELOR 858

21.1 Biosinteza proteinelor 858
21.1.1 Specificitatea tRNA 863
20.1.1.1 Forme multiple de *t*RNA pentru același aminoacid 864
21.1.2 Inițierea catenei polipeptidice 871
21.1.3 Alungirea catenei polipeptidice 874
21.1.4 Terminarea catenei polipeptidice 877
21.1.5 Inhibitorii sintezei proteinelor 878
21.1.6 Alte aspecte ale biosintezei proteinelor 879
21.1.7 Controlul sintezei proteice 881
21.1.8 Alți factori care influențează biosinteza proteinelor 886
21.2 Digestia și absorbția proteinelor 887
21.3 Metabolismul cromoproteidelor 888
21.3.1 Biosinteza cromoproteidelor porfirinice 888
21.3.2 Catabolismul cromoproteidelor 890

22. METABOLISMUL APEI ȘI ELEMENTELOR MINERALE 893

22.1 Apa 893
22.2 Sîngele 897
22.3 Fluide, umori, secreții și lichide biologice 900
22.3.1 Fluidul interstițial 900
22.3.2 Limfa 901
22.3.3 Fluidul sinovial 901
22.3.4 Umoarea apoasă 901
22.3.5 Fluidul cefalorahidian 901
22.3.6 Transpirația 902
22.3.7 Secrețiile lacrimale 902
22.3.8 Saliva 902
22.3.9 Secrețiile gastrice 903
22.3.10 Secreția pancreatică 904
22.3.11 Secrețiile intestinale 905
22.3.12 Secreția biliară 905
22.4 Elementele minerale 906
22.4.1 Sodiul, clorul și fosforul 907

22.4.2 Calciul și fosforul 908
22.4.3 Magneziu 910
22.4.4 Fier 911
22.4.5 Sulf 911
22.4.6 Cupru 911
22.4.7 Zinc 912
22.4.8 Mangan 913
22.4.9 Cobalt 914
22.4.10 Crom 914
22.4.11 Molibden 914
22.4.12 Litiu 915
22.4.13 Iod 915
22.4.14 Fluor 916
22.4.15 Seleniu 916
22.5 Echilibrul acido-bazic 917
22.5.1 Dereglări ale echilibrului acido-bazic 927
22.5.1.1 Acidoza și alcaloza metabolică 927
22.5.1.2 Acidoza și alcaloza respiratorie 928
Bibliografie 929
Indice alfabetic 953

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

PRESCURTĂRI UTILIZATE ÎN TEXT

A, dA — Adenozină, 2-deoxiadenozină
Å — Angstrom (1Å = 0,1 nm)
ACTH — Hormon adrenocorticotrop (corticotropin)
ADH — Hormon antidiuretic (vasopresina)
ADP — Acid adenozin 5′-pirofosforic
AE — celuloză — Aminoetil celuloză
AMP — Acid adenozin 5′-monofosforic sau acid adenilic
cAMP — Acid adenozin-3′, 5′-monofosforic ciclic
ATP — Acid adenozin 5′-trifosforic
Acil SCoA — Esterii acizilor graşi cu CoASH
Ala — Alanină
Ara — Arabinoză
Araf şi Arap — Formele furanozil şi piranozil ale arabinozei
Arg — Arginină
Asn — Asparagină
Asp — Acid aspartic
Asx — Acid aspartic sau asparagină (neprecizat)
atm — Atmosferă (1 atm = 101,325 Pa)
C — Citidină
c — Concentraţie
C° — Grade Celsius
CDP — Acid citidin 5′-pirofosforic
CG — Coriogonadotropin
CM-celuloza — Carboximetil celuloza
CMP — Acid citidin 5′-monofosforic
CoA sau CoASH. Coenzimă *A*
CRF — corticoliberin
crist. — Cristalizat,ă
CS — Coriomamotropin
CTP — Acid citidin 5′-trifosforic
Cys — Cisteină
Cys-Cys — Cistină
d — Prescurtarea prefixului deoxi-
$D_{20,W}$ — Coeficient de difuzie, folosit şi pentru coeficientul de sedimentare
dalton — $^1/_{12}$ din masa unui atom de carbon sau a unui izotop al carbonului ^{12}C, adică $1{,}663 \times 10^{-24}$ g

dansil — 5-Dimetilaminonaftalen-1-sulfonil
DEAE-celuloză — Dietilaminoetil-celuloză
dină — Unitate de forță (o dină = 10^{-5}N)
DNA — Acid deoxiribonucleic
DN-aza — Deoxiribonuclează
Dol-Ⓟ, Dol-Ⓟ-Ⓟ ; Dolicol fosfat, respectiv dolicol pirofosfat
E — Enzimă
E_0 — Potențial de electrod standard
E_0' — Potențial de electrod standard, la un *p*H anumit
ECTEOLA-celuloză — Trietanolamină cuplată la celuloză prin catene gliceril și poligliceril; rezultă grupări mixte
EDTA — Etilendiaminotetraacetat
FAD — Flavinadenindinucleotid
FMN — Flavinmononucleotid
Fru — Fructoză
FSH — Hormon foliculostimulator (Folitropin)
FSH-RF — Foliberin
Fuc — Fucoză
g — Gram
g — Unități gravitaționale pentru centrifugă
G — Guanozină
Gal — Galactoză
Galp — Galactopiranoză
GalA — Acid galacturonic
GalNAc — N-acetilgalactozamină
GDP — Acid guanozin-5′-pirofosforic
Glc — Glucoză
GlcA — Acid glucuronic
GlcN — Glucozamină
Glcp — Glucopiranoză
Gln — Glutamină
Glu — Acid glutamic
Glx — Acid glutamic sau glutamină (neprecizat)
Gly — Glicina
GE — celuloză — Guanidinoetil-celuloză
GMP — Acid guanozin-5′-monofosforic
cGMP — Acid guanozin-3′, 5′-monofosforic ciclic
GOT — Glutamat oxaloacetat transaminaza (L-aspartat : 2-oxoglutarat aminotransferaza)
GPT — Glutamat piruvat transaminaza (L-alanin :2-oxoglutarat aminotransferaza)
GSH — Glutation redus
GSSG — Glutation oxidat
GTP — Acid guanozin-5′-trifosforic
ΔG — Energie liberă (kj × mol^{-1})
μg — Microgram
h — Oră
Hb — Hemoglobină
Hem — Grupare prostetică a Hb
ΔH — Entalpia (kj × mol^{-1})

pH — lg cu semn (—) al concentrației ionilor de hidrogen
pH_i, pI — pH izoelectric, punct izoelectric
HGF — Glucagon, factor hiperglicemiant
His — Histidină
Hyl — Hidroxilizină
Hyp — Hidroxiprolină
I — Tărie ionică
I — Inozină
IDP — Acid inozin 5′-pirofosforic
Ile — Izoleucină
IMP — Acid inozin 5′-monofosforic
IR — Infraroșu
ITP — Acid inozin 5′-trifosforic
j — Joul ($m^2 \cdot kg \cdot s^{-2} = N.m$)
k — Constantă de viteză
K — Constantă de echilibru
K° — Grade Kelvin
K_s — Constantă de disociere a complexului enzimă-substrat
K_M, K_m — Constantă Michaelis
kg — Kilogram
pK — lg cu semnul (—) al constantei de disociere
l — Litru (10^{-3} $m^3 = dm^3$)
LDH — Lactat dehidrogenaza
Leu — Leucină
lg — Logaritm în baza 10
lg (I_0/I) — Extincție
LH — Hormon luteinizant (lutropin)
LH/FSH—RF — Gonadoliberin
LH-RF(LRF) — Luliberin
LPH — Hormon lipotropic (lipotropin)
Lys — Lizina
m — Metru
Man, Manp, Manf — Manoză, respectiv formele piranozice și furanozice
MDH — Malat dehidrogenaza
Met — Metionina
MIF — Melanostatin
min — Minut
ml — Mililitru
mM — Milimolar
MRF — Melanoliberin
MSH — Hormon melanocitostimulator (melanotropin)
nm — Micron (10^{-6}m)
μmol — Microgram atom
N — Newton ($m \times kg \times s^{-2} = j \times m^{-1}$)
N — Nucleozid nespecific (întîlnit în catenele polinucleotidice)
NAc — N-acetil derivat
NAc Glc — N-acetil glucoză
NAc Mur — Acid N-acetil muramic
NAD^+ — Niacinamidadenindinucleotid oxidat
$NADH+H^+$ — Niacinamidadenindinucleotid redus

$NADP^+$ — Niacinamidadenindinucleotid fosforilat oxidat
$NADPH+H^+$ — Niacinamidadenindinucleotid fosforilat redus
NANA — Acid N-acetil neuraminic
NMN — Niacinamid mononucleotid (flavin mononucleotid)
Orn — Ornitină
Ⓟ — Fosfat anorganic
Ⓟ—O—Ⓟ — Pirofosfat
P — celuloză — Fosfat celuloză
PAB — celuloză — p-Aminobenzil-celuloză
PEI — celuloză — Polietilenimină adsorbită pe celuloză
Phe — Fenilalanină
PIF — Prolactostatin
poli (A) — Polimer simplu al adenozinei
poli (A_3C_2) — Random copolimer al dA şi dC
poli (A—T) sau poli (dA—dT) — Copolimer alternativ al dA şi dT
PRF — Prolactoliberin
Pro — Prolină
R,R′,R″ etc. — Substituenţi sau radicali în compuşi
R — Nucleozidă purinică nemenţionată (în polinucleotide)
RES — Rezonanţă electronică de spin
R_F — Factor de partiţie, în cromatografie
Rha — Ramnoză
Rib — Riboză
*d*Rib — 2-Deoxiriboză
RMN — Rezonanţă magnetică nucleară
RNA — Acid ribonucleic
*m*RNA — Acid ribonucleic mesager
*r*RNA — Acid ribonucleic ribozomal
*t*RNA — Acid ribonucleic de transport
RNA-aza — Ribonuclează
s — Secundă
S — Unităţi Svedberg (10^{-13} s)
S_{20w}, S_{20} — Coeficient de sedimentare, corectat la 20°C, în apă
S^0, S^0_{20} — Coeficient de sedimentare la concentraţia zero şi 20°C
—S—S— Punte disulfurică
ΔS — Entropia (kj × mol^{-1} × K^{-1})
SE-Celuloză — Sulfoetil-celuloză
Ser — Serină
SP-Celuloză — Sulfopropil-celuloză
SRF — Somatoliberin
STH — Hormon somatotrop (somatotropin)
T — Timină
T — Temperatura absolută
t — Temperatura
TEAE-celuloză — Trietilaminoetil-celuloză
Thr — Treonină
T_m — Punctul de topire al DNA
TRIS — 2-Amino-2-hidroximetilpropan-1,3-diol
TRF — Tiroliberin

Trp — Triptofan
TSH — Hormon tirotrop (tirotropin)
Tyr — Tirozină
dt — 2′-Deoxiribozil timină (timidină)
*d*TDP — Acid timidin 5′-pirofosforic
*d*TMP — Acid timidin 5′-monofosforic
*d*TTP — Acid timidin 5′-trifosforic
U — Uridină
UA — Acid uronic sau rest al acestuia
UDP — Acid uridin 5′-pirofosforic
UMP — Acid uridin 5′-monofosforic
UTP — Acid uridin 5′-trifosforic
UV — Ultraviolet
V — Volt ($m^2 \times kg \times s^{-3} \times A^{-1} = j \times A \times s^{-1} = j \times C^{-1}$)
V — Viteză maximă (în enzimologie)
v — Viteză
Val — Valină
Veronal — Acid 5,5′-dietilbarbituric
X — Xantozină
XDP — Acid xantozin 5′-pirofosforic
XMP — Acid xantozin 5′-monofosforic
XTP — Acid xantozin 5′-trifosforic
Xyl — Xiloză
W — Vat
X — Nucleozid pirimidinic nemenționat (în polinucleotide)
$[\alpha]_D^{20}$; $[\alpha]_{5461}^{25}$ — Rotația optică specifică (conc. lg/ml, într-o cuvă cu drumul optic de 10 cm)
$[\alpha]_\lambda^t \times$ mmol — Rotația optică moleculară
η — Viscozitate
η_{rel} — Viscozitate relativă
η_{sp} — Viscozitate specifică (rel-l)
$\eta sp/c$ — Viscozitate redusă (unități; ml/g)
$[\eta]$ — Viscozitate intrinsecă, adică $\lim\ c \to 0\ sp/c$
λ — Lungime de undă
ψ — 5′-Riboziluracil (Pseudouridina)

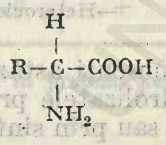
BCU IASI CENTRALA UNIVERSITARA LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1

AMINOACIZII
UNITĂȚILE STRUCTURALE ALE PROTEINELOR

Aminoacizii sînt substanțe organice în a căror structură se întîlnesc concomitent două grupări funcționale : amino și carboxil și au următoarea formulă generală :



În structura tuturor aminoacizilor naturali gruparea amino se găsește în poziția α față de gruparea carboxil.

De la această regulă generală fac excepție aminoacizii, puțini la număr, în a căror structură se întîlnesc două grupări carboxil și două grupări amino, cei care conțin grupări imino, sau aminoacizii la care gruparea funcțională amino nu este legată de atomul de carbon din poziția α.

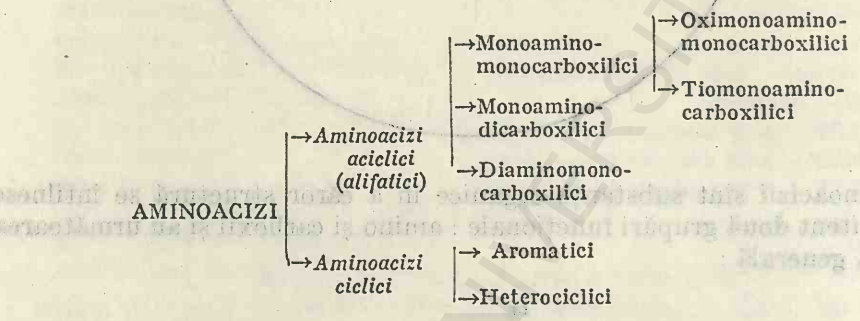
Majoritatea aminoacizilor naturali cunoscuți în prezent au o configurație *L*, însă în natură se întîlnesc, mult mai rar, și aminoacizi cu configurația *D*. Astfel, de exemplu, *D*-valina a fost identificată în structura antibioticului *gramicidina D;* acidul D-glutamic se întîlnește în acidul poliglutaminic al capsulei celulelor de *Bacillus subtilis*, *B. anthracis* precum și alte bacterii, D-serina a fost identificată în compoziția *polimixinei* etc. Cu toate că aminoacizii din seria *D* nu au fost identificați în hidrolizatele proteice, prezența lor sub formă de peptide și uneori în stare liberă în unele microorganisme, plante și animale este pe deplin demonstrată.

1. AMINOACIZII

Aminoacizii constituie unitatea structurală fundamentală a moleculelor de proteină. Hidroliza proteinelor, la cald şi în prezenţa acidului sulfuric concentrat evidenţiază, de regulă, prezenţa în compoziţia lor a cel puţin 20 aminoacizi.

Aminoacizii separaţi din hidrolizatele de proteină pot fi clasificaţi, în funcţie de structura lanţului hidrocarbonat, în două mari categorii : *aminoacizi alifatici* sau *aciclici* şi *aminoacizi ciclici*. Dacă se ia în considerare poziţia grupării amino faţă de gruparea carboxil se deosebesc α şi β-aminoacizi, iar după numărul grupărilor amino şi carboxil — acizi *monoaminomonocarboxilici*, *monoaminodicarboxilici* şi *diaminomonocarboxilici*.

După natura ciclului aminoacizii ciclici pot fi grupaţi la rîndul lor în două subgrupe : *aminoacizi aromatici* şi *aminoacizi heterociclici*.



Majoritatea aminoacizilor cunoscuţi astăzi în biochimie au fost separaţi de nenumărate ori din hidrolizatele proteice şi structura lor a fost confirmată prin analiză chimică sau prin sinteză de laborator. Din diferite produse naturale au fost izolaţi însă şi alţi aminoacizi care nu se întîlnesc constant în compoziţia proteinelor sau care se găsesc în natură în stare liberă în cantităţi relativ mici. Alţi aminoacizi reprezintă produse intermediare ale metabolismului.

Răspîndirea principalilor aminoacizi în unele proteine naturale este redată procentual în tabelul 1.1.

1.1. AMINOACIZI ACICLICI SAU ALIFATICI

1.1.1 Acizii monoaminomonocarboxilici

Glicocolul, glicina sau **acidul α-aminoacetic** este cel mai simplu aminoacid. A fost izolat pentru prima dată în anul 1820 de către Braconnot din hidrolizatul de gelatină şi are un gust dulce, de unde şi denumirea de glicocol (glycos = dulce şi colla — clei). În anul 1858 Cahours stabileşte structura glicocolului şi realizează sinteza lui în laborator utilizînd

TABELUL 1.1

Conținutul aminoacizilor în unele proteine vegetale și animale (calculat în procente, în raport cu conținutul procentual al azotului proteic de 16%)

Aminoacidul \ Proteina	Zeina *	Gliadina din grîu	Edestina din cînepă	Insulina	Proteine musculare	Albumina din serul bovin
Glicocol	0,00	1,0	—	6,9	4,0	1,82
Alanină	9,9	2,5	4,3	6,8	—	6,25
Izoleucină	4,3	4,7	7,5	2,6	3,4	2,61
Leucină	23,7	—	6,0	12,0	12,1	12,27
Valină	2,4	3,0	5,7	8,0	3,4	5,92
Serină	—	0,1	6,3	6,0	5,7	4,23
Treonină	2,4	3,0	3,9	2,1	5,3	5,83
Acid aspartic	3,4	1,4	12,0	—	—	10,91
Acid glutamic	35,6	20,7	46,0	15,0	15,0	16,50
Arginină	1,6	3,2	16,7	2,1	7,2	5,90
Lizină	0,00	0,6	2,4	2,1	7,6	12,82
Cisteină + cistină	0,8	2,3	0,9	12,5	1,1	6,52
Metionină	2,4	2,3	2,4	—	3,2	0,81
Fenilalanină	6,4	2,5	5,5	5,9	4—5	6,59
Tirozină	5,0	3,1	4,3	8,7	3,1	5,06
Triptofan	0,1	0,9	1,5	—	1,2	0,50
Histidina	0,9	2,1	2,9	3,6	2,1	4,00
Prolină	9—12	13,2	4,3	2,7	6,0	4,75
Oxiprolină	1,0	—	—	—	—	—

* 0,0 aminoacidul este absent în proteina respectivă
** — nu s-a determinat

acid monocloracetic și amoniac. Ulterior, glicocolul a fost izolat sub formă cristalizată.

*Glicocolul poate fi sintetizat de către organismul animal și este deci un aminoacid neesențial** . El intră în compoziția glutationului și a acizilor biliari. Sub forma de amidă, glicocolul se întîlnește în compoziția ocitocinei și vasopresinei (cap. 2). N-metil derivatul glicocolului, sarcozina, se găsește în natură, constituind un produs al metabolismului intermediar la mamifere (cap. 19), în hidrolizatele proteinelor extrase din arahide, și în compoziția unor antibiotice (actinomicine).

Formulele structurale ale aminoacizilor și ale unor derivați naturali precum și simbolurile și prescurtările recomandate de Comisia pentru nomenclatură biochimică de pe lîngă IUB-IUPAC sînt redate în tabela 2.2.

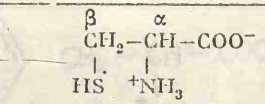
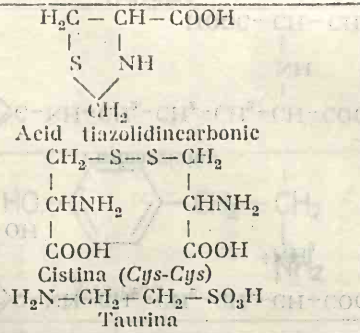
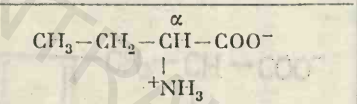
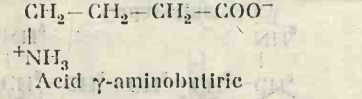
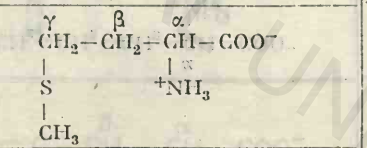
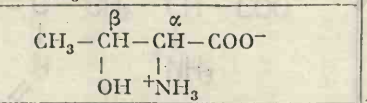
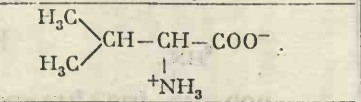
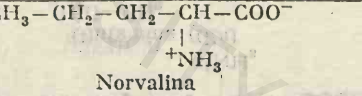
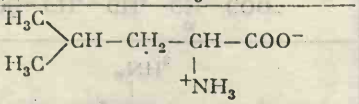
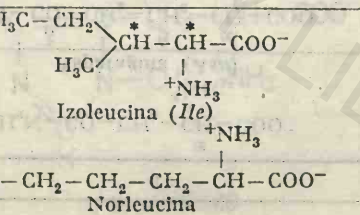
Glicocolul participă la numeroase procese importante pentru organism : sinteza creatinei și pirolului, conjugarea cu produsele metabolice toxice pentru organism — acidul benzoic, acidul nicotinic etc. (cap. 19).

* Aminoacizii sintetizați de organism se mai numesc și *aminoacizi neesențiali*, iar cei care nu pot fi sintetizați de acesta — *aminoacizi esențiali*.

*Principalii aminoacizi întîlniți în structura proteinelor naturale: nomenclatură și denumiri prescurtate. Produși naturali derivați de la aminoacizii naturali**

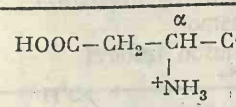
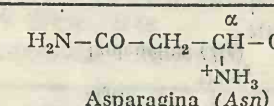
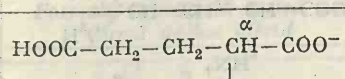
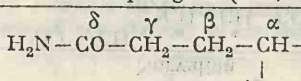
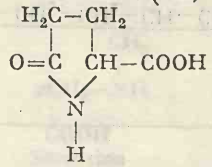
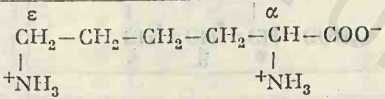
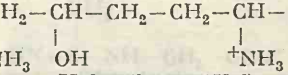
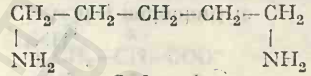
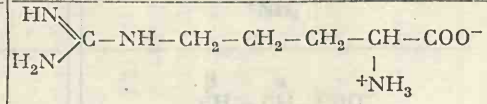
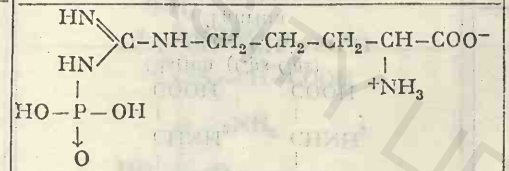
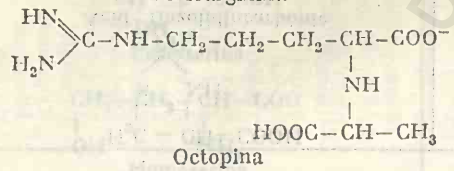
Denumirea aminoacidului și prescurtarea IUB–IUPAC	*Formula structurală scrisă sub formă de ion hibrid*	*Alți compuși cu formulă structurală apropiată sau derivați ai aminoacidului*	*Însemnări speciale*
1	2	3	4
I. *Aminoacizi aciclici sau alifatici.*			
Glicocol, glicina (*Gly*)	$\overset{+}{\alpha}CH_2NH_3^-$ $\vert$ COO^-	CH_3 $\vert$ αCH_2-NH $\vert$ $COOH$ Sarcozina NH_2 $\vert$ $HN=C-NH-CH_2-COO^-$ Glicociamina	Glicociamina a fost izolată din urină; în organism este precursor în biosinteza creatinei și creatininei
α-Alanina (*Ala*)	$CH_3-\overset{\alpha}{CH}-COO^-$ $\vert$ $^+NH_3$	$\overset{\beta}{CH_2}-\overset{\alpha}{CH}-COO^-$ $\vert$ $^+NH_3$ β-alanina	
Serina (*Ser*)	$\overset{\beta}{CH_2}-\overset{\alpha}{CH}-COO^-$ $\vert\quad\vert$ $OH\ \ ^+NH_3$	$CH_2-CH-COOH$ $\vert\quad\vert$ $O\quad NH_2$ $\vert$ $HO-P\rightarrow O$ $\vert$ OH Fosfoserina $CH_2-CH_2-CH-COO^-$ $\vert\qquad\vert$ $OH\qquad ^+NH_3$ Homoserina	

BCU "CAROL I" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

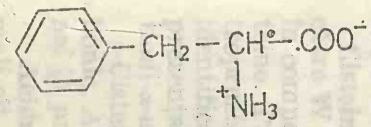
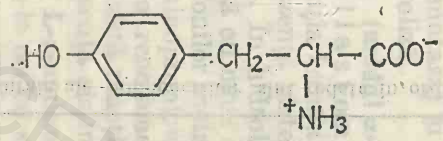
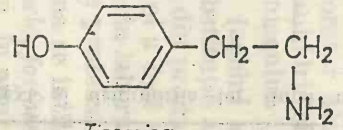
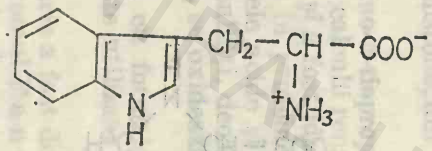
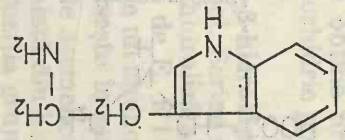
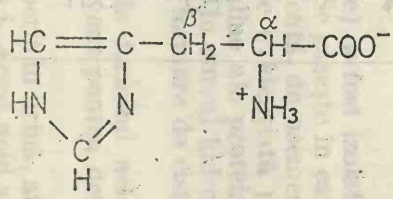
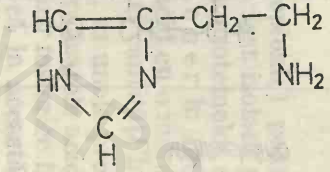
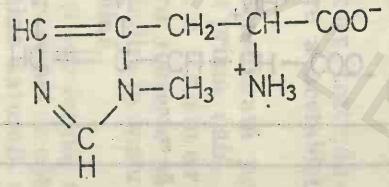
Cisteina (*Cys*)			Taurina se găsește sub formă liberă în țesutul muscular al nevertebratelor; la mamifere se întîlnește sub forma de acid taurocolic.
Acid *L*-α-aminobutiric			Acidul γ-amino-*n*-butiric se găsește în stare liberă în creier, plămîni și în inimă.
Metionina (*Met*)			
Treonina (*Thr*)			
Valina (*Val*)			
Leucina (*Leu*)			

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

TABELUL 1.2 (continuare)

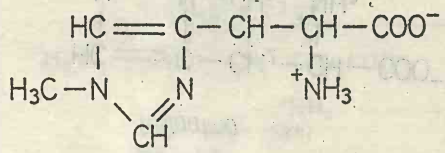
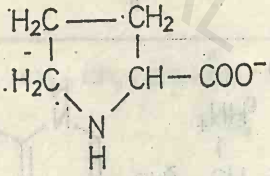
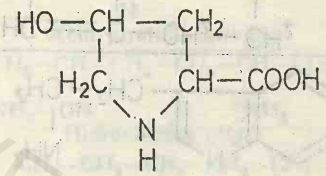
1	2	3	4
Acid aspartic (*Asp*)		 Asparagina (*Asn*)	
Acid glutamic (*Glu*)		 Glutamina (*Gln*)  Acid pirolidincarbonic	
Lizina (*Lys*)		 Hidroxilizina (*Hyl*)  Cadaverina	
Ariginina (*Arg*)		 Fosfoarginina  Octopina	

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Fenilalanina (*Phe*)			
Tirozina (*Tyr*)		 *Tiramina*	
Triptofan (*Trp*)		 *Triptomina*	
Histidina (*His*)		 *Histamina*  *1-Metilhistidina*	1- şi 3-Metilhistidina au fost izolate din urina subiecţilor normali unde se găsesc sub formă de acizi liberi

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

TABELUL 1.2 (continuare)

1	2	3	4
		 *3-Metilhistidina*	
Prolina (*Pro*)		 *Hidroxiprolina* (Hyp)	

* Formulele structurale ale aminoacizilor sînt redate în ordinea din text și denumirile lor după nomenclatura de la Geneva sînt omise.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Alanina (acidul α-aminopropionic) este omologul superior al glicocolului şi se găseşte în natură sub două forme : α-alanina şi β-alanina. α-Alanina a fost separată din produsele hidrolizei alcaline a fibroinei (proteina izolată din mătasea naturală) şi se găseşte în toate proteinele naturale. α-Alanina este sintetizată de organismul animal fie din alţi aminoacizi, fie prin aminarea acidului piruvic.

β-Alanina este singurul β-aminoacid întîlnit în natură. Nu se găseşte însă în stare liberă ci numai sub formă combinată, constituind o componentă a acidului *pantotenic* (vezi cap. 8) sau a dipeptidului *carnozina*, izolat din ţesutul muscular al mamiferelor.

În laborator alanina se obţine prin reacţia S t r e c k e r, tratîndu-se cu acid cianhidric şi acid clorhidric produsul de condensare a acetaldehidei şi amoniacului.

Serina (acidul α-amino-β-hidroxipropionic) poate fi considerată produs de substituţie al alaninei. Serina a fost izolată pentru prima dată în anul 1865 din produsele de hidroliză ale proteinelor de către C r a m e r şi structura ei a fost stabilită de E. F i s c h e r în 1902, care reuşeşte să o sintetizeze în laborator. Este un aminoacid cu o mare răspîndire în macromoleculele proteice şi se găseşte în mari cantităţi în **fibroină**.

Serina se întîlneşte, de asemenea, în unele produse şi sub formă de ester fosforic, *fosfoserina* izolată din hidrolizatele acide ale cazeinei de către L i p m a n, în anul 1933. Poziţia grupării fosforice în cazeina naturală nu se cunoaşte cu precizie. Se presupune că în această proteină există legături N-fosforice, care în cursul hidrolizei migrează cu formarea de legături O-fosforice. Fosfoserina a fost identificată şi în unele enzime (fosforilaza, fosfoglucomutaza) şi în histone, din care a fost izolată prin electroforeză, după hidroliză.

Cisteina (acidul α-amino-β-tiopropionic) a fost izolată în anul 1810 de către W o l l a s t o n din calculii renali. Se găseşte în cantităţi importante în compoziţia *keratinelor* şi a fost identificată, de asemenea, şi în alte proteine. Prezenţa cisteinei în proteine este evidenţiată prin reacţia cu nitroprusiat. În hidrolizatele acide şi alcaline ale proteinelor cisteina este identificată cu mari dificultăţi, deoarece în cursul hidrolizei, îndeosebi în prezenţa ionilor metalici, se oxidează cu formare de cistină (acid β, β′-ditiodi-α-aminopropionic).

Cisteina reacţionează cu formaldehida formînd acidul tiazolidincarbonic. Această reacţie este utilizată frecvent pentru determinarea cisteinei în prezenţa cistinei.

Acidul L-α-aminobutiric a fost descoperit în urină, atît la oamenii normali cît şi la cei cu sindromul F a n c o n i. Acest acid se găseşte în stare liberă în ţesuturile animale şi vegetale, însă nu a fost identificat în structura proteinelor. Din ţesutul nervos central al animalelor şi din unele plante a fost izolat pe cale cromatografică *acidul γ-aminobutiric*. Ulterior, acest acid a fost obţinut sub formă de cristale. Bacteriile sintetizează acid γ-aminobutiric din acid glutamic.

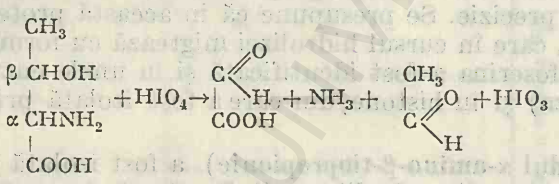
În proteinele native se întîlnesc în cantităţi relativ importante doi derivaţi ai acidului L-α-aminobutiric, *metionina* şi *treonina*.

Metionina (acidul α-amino-γ-metiltiobutiric) a fost descoperită în anul 1922 de către M ü l l e r în hidrolizatele de cazeină, iar în 1928 B a r g e r

și Cogne realizează sinteza metioninei folosindu-se de reacția Strecker. Metionina este un aminoacid larg răspîndit în proteinele native în care se găsește însă în cantități relativ mici. Acest aminoacid joacă în organism un rol deosebit de important, deoarece poate ceda ușor gruparea-CH_3 *labilă* — care este utilizată de țesuturi pentru metilarea diferitelor produse ale metabolismului intermediar celular. Prin cedarea grupării metil, metionina se transformă în homocisteină compus care nu se întîlnește în compoziția proteinelor naturale. Metionina nu poate fi sintetizată de animale și este deci un *aminoacid esențial*.

Treonina (acidul α-amino-β-hidroxibutiric), homologul superior al serinei, a fost izolată pentru prima dată în anul 1935 din hidrolizatele de fibrină, de către Rose și alții. Treonina se întîlnește frecvent, însă în cantități mici, și în alte proteine. Organismul animal nu sintetizează treonină. Descoperirea treoninei a facilitat experiențele prin care s-a demonstrat că șobolanii pot crește normal și la o dietă constituită numai din aminoacizi puri. Carter în anul 1935 reușește să obțină treonină și pe cale sintetică, iar mai tîrziu West și Carter separă patru stereoizomeri ai acestui aminoacid.

Treonina se găsește și în stare liberă, sub formă de ester fosforic O-fosfotreonină, și asemenea serinei, care este tot un hidroxiaminoacid, reacționează cu acidul periodic cu formare de acid glioxalic, amoniac și aldehidă acetică. Această reacție este utilizată pentru determinarea cantitativă a hidroxiaminoacizilor (treonina și serina).



L-Valina (acidul α-aminoizovalerianic) a fost descoperită în extractele de pancreas, în anul 1856, de către von Gorup-Besanez, iar în 1879 izolată din hidrolizatele proteice. Este un aminoacid care nu poate fi sintetizat de către organism și este eliberat din proteine numai după scindarea hidrolitică a acestora. În natură, în structura antibioticului *gramicidina* și în *actinomicine*, valina există și sub forma *D*.

Norvalina (acidul aminovalerianic), izomerul *L*-valinei cu catenă normală, nu a fost identificată în compoziția proteinelor native.

Izoleucina (acidul α-metil-β-aminovalerianic) a fost izolată în 1904 din melasa de sfeclă de zahăr de către Erlich, iar mai tîrziu din hidrolizatele de fibrină, din cleiul de amidon obținut din grîu, din albușul de ou și din carne. Izoleucina are doi atomi de carbon asimetrici și prezintă două centre de asimetrie, avînd patru izomeri optic activi. În proteine izoleucina se găsește în cantități relativ mici.

L-Leucina (acidul α-aminoizocapronic) este mult mai răspîndită decît *L*-izoleucina și în unele proteine, de exemplu, în globina din hemoglobină, formează aproximativ o treime din totalul aminoacizilor. A fost izolată pentru prima dată în anul 1839 din hidrolizatele alcaline ale țesutului muscular.

1.1.2 Acizii monoaminodicarboxilici

Din această grupă fac parte trei aminoacizi : *acidul aspartic*, *glutamic* şi *hidroxiglutamic*. Datorită prezenţei în molecula lor a celor două grupări carboxil aceşti compuşi au un caracter net acid.

Acidul L-aspartic (acidul α-aminosuccinic) a fost izolat pentru prima dată din hidrolizatele proteinelor de origine vegetală. Derivatul său acidul N-acetilaspartic se găseşte în extractele creierului de pisică şi de şobolan (100 mg%) iar în cantităţi mai mici (între 1—3 mg%) în ficat, rinichi, creier şi în urină de pisică. Acidul aspartic se întîlneşte în cantităţi mari în compoziţia proteinelor vegetale şi, de asemenea, în proteinele animale. Este un aminoacid neesenţial, în organism rezultînd după degradarea tisulară a proteinelor şi în urma biosintezei lui.

Cu mult înainte de descoperirea acidului L-aspartic a fost cunoscută β-amida acestuia — *asparagina*, care dealtfel a fost *primul aminoacid izolat din produsele naturale*, în anul 1804, din sucul de sparanghel.

Prezenţa asparaginei în proteine a fost demonstrată mult mai tîrziu, în anul 1932, de către D a m o d a r a n care reuşeşte să separe asparagina din hidrolizatele enzimatice ale *edestinei*, proteină de origine vegetală. Amida acidului aspartic este o substanţă foarte larg răspîndită în natură. Ea se acumulează în cantităţi relativ mari la unele plante superioare, iar la animale se găseşte şi în stare liberă.

Acidul L-glutamic (acidul α-aminoglutaric) a fost izolat în anul 1866 de R i t t h a u s e n din hidrolizatul cleiului de amidon obţinut din endospermul de grîu, iar în 1890 W o l f realizează sinteza lui în laborator. Este un aminoacid deosebit de răspîndit în produsele naturale şi care îndeplineşte un rol important în metabolism. Se întîlneşte, de asemenea, în structura glutationului, iar sub formă de sare monosodică se utilizează în alimentaţie drept condiment.

Glutamina (acidul γ-amido-α-aminoglutaric) a fost descoperită cu 17 ani mai tîrziu decît acidul glutamic şi izolată din sucul de sfeclă în anul 1883 de către S c h u l t z e şi B o s s h a r d. Prezenţa ei în proteinele native a fost demonstrată de către D a m o d a r a n şi a l ţ i i (1932) care au reuşit să o separe din hidrolizatele enzimatice ale edestinei.

Glutamina se formează prin amidarea acidului glutamic şi se găseşte în stare liberă în ţesuturile vegetale şi animale. Ea se întîlneşte în structura proteinelor, îndeosebi, a proteinelor de origine vegetală, iar în sîngele mamiferelor constituie unul din componenţii principali ai aminoacizilor sanguini.

Glutamina se caracterizează printr-o mare labilitate a grupării amido, putînd fi uşor ciclizată cu formarea sării de amoniu a acidului *pirolidincarbonic*. Această ciclizare a glutaminei *in vitro* este catalizată de fosfaţi şi de alţi anioni.

1.1.3 Acizii diaminomonocarboxilici

L-Lizina (acidul α, ε-diaminocapronic) a fost separată din hidrolizatele de cazeină în anul 1889 de către D r e c h s e l şi în 1902 E. F i s c h e r reuşeşte să o obţină prin sinteza în laborator. În proteine conţinutul lizinei

variază în limite foarte largi; se întîlnește, de regulă, în proteinele animale, însă poate fi prezentă în cantități neînsemnate în proteinele de origine vegetală, de exemplu în *zeină* și *gliadină*. În proteinele native gruparea ε-amino a lizinei se găsește în stare liberă. Totuși, în unele combinații biochimice, de exemplu, în *biocitină* lizina este prezentă sub formă legată, gruparea ε-amino fiind blocată.

Lizina este un aminoacid esențial organismul animal fiind foarte sensibil la carența lizinei din alimentație. Derivatul lizinei ε-*oxilizina* descoperit în anul 1938, în hidrolizatele de *colagen* și *gelatină* — se găsește în proteine în cantități incomparabil mai mici decît lizina însăși. Lizina este decarboxilată de unele microorganisme cu formare de *cadaverină*, o diamină toxică din grupa *ptomainelor*.

În histone lizina a fost identificată sub formă de ε-*N-acetillizină*, formă sub care ea poate fi întîlnită și în proteinele modificate prin acetilare cu *acetilimidazol* sau cu anhidridă acetică. În alte proteine, de exemplu, în proteinele ribozomale, flagelină, histone, în citocromii *c* și în proteinele musculare au fost identificate ε-N-metillizine sub formă de ε-*N-monometillizină*, ε-*N-dimetillizină* și ε-*N-trimetillizină*. Derivații metilați ai lizinei sînt stabili în cazul hidrolizei acide a proteinelor și pot fi ușor identificați prin metodele obișnuite de analiză.

Hidroxilizina este identificată în cantități relativ semnificative în gelatină și în colagen și este stabilă în condițiile hidrolizei acide a acestora. Din peretele celular al diatomeelor au fost izolați doi derivați ai lizinei — *trimetil hidroxilizina* și *trimetil hidroxilizinfosfatul* (N a k a j i m a și V o l c a n i, 1970), iar în structura nucleozid difosfatkinazei a fost identificată ε-*N-fosfolizina* (W a l i n d e r, 1968).

Printre produsele de hidroliză ale moleculelor de colagen și edestină au fost identificate prin tehnica modernă a separării cu ajutorul analizoarelor automate de aminoacizi, *desmozina* și *izodesmozina*, produși de condensare ai aldehidelor formate în cursul procesului de hidroliză. Desmozina poate fi considerată o tetrapeptidă cu un heterociclu piridinic azotat și care conține patru resturi de lizină (v. pag. 33).

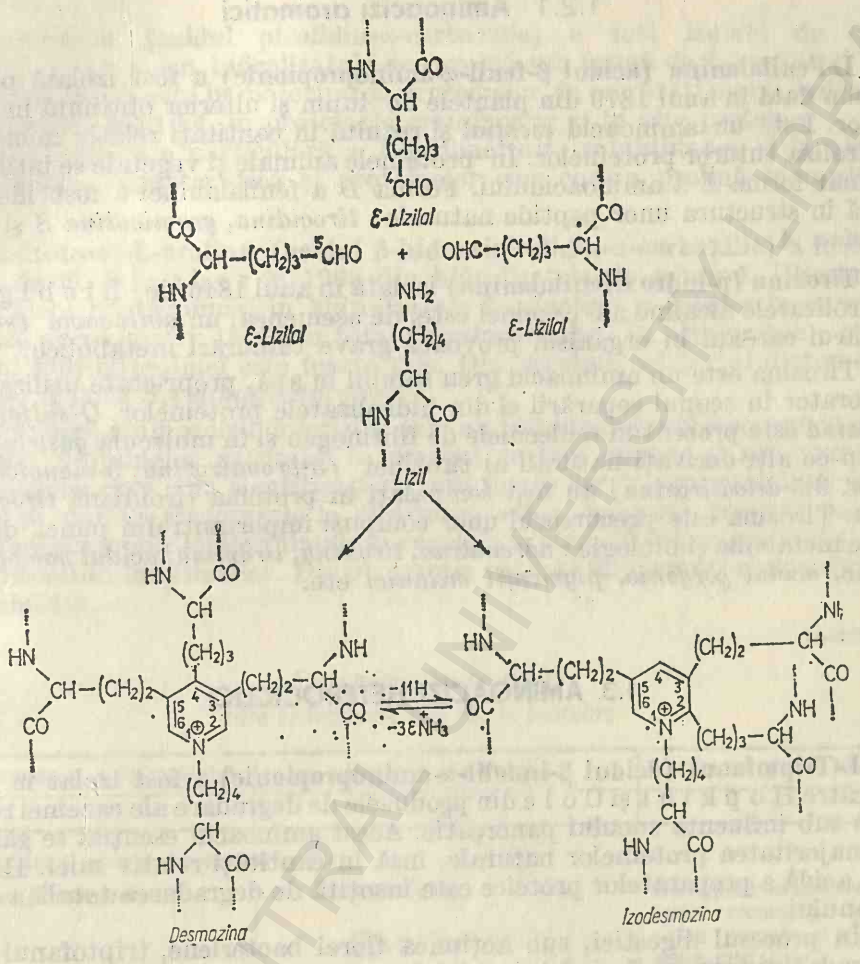
Arginina (acidul δ-guanidino-α-aminovalerianic) a fost izolată pentru prima dată în 1886 din frunzele etiolate ale plantelor de lupin. Ulterior, arginina a fost descoperită în cantități importante în hidrolizatele *protaminelor* și *histonelor*, dar se întîlnește și în compoziția altor proteine. De exemplu, proteinele nucleului celular, proteinele țesuturilor în creștere (țesuturile embrionare, carcinoamele) sînt bogate în arginină.

Arginina se găsește în mușchii nevertebratelor atît sub formă liberă cît și sub formă de *fosfoarginină*. Ea a fost descoperită și în structura *octopinei* și a *acidului argininosuccinic* *.

---

* În histone, miozină, proteinele tecii mielinice și în proteinele acide nucleare s-a identificat prezența metilargininelor : N^G-*monometilarginina*, $N^G\,N^G$-*dimetilarginina* (simetrică și asimetrică) care au fost separate electroforetic și cromatografic. Indicele *G* indică faptul că metilarea are loc la nivelul grupării guanidil.

Gruparea guanidinică a argininei este hidrolizată atît în mediu de $Ba(OH)_2$ şi la temperatura de 100°C, precum şi sub influenţa unei enzime *arginaza*—cu formare de uree şi ornitină. În condiţiile unui tratament mai



blînd, de exemplu, tratată cu o cantitate echimoleculară de soluţie apoasă de $Ba(OH)_2$, arginina se descompune cu formare de amoniac şi citrulină. Produsele rezultate în ambele cazuri — *ornitina* şi *citrulina* — sînt de fapt acizi diaminomonocarboxilici care *se formează în organism în cadrul ciclului ureogenetic* (vezi cap. 19).

Citrulina şi ornitina nu au fost identificate în structura proteinelor. Ornitina apare uneori în cursul hidrolizei proteinelor, probabil ca produs secundar, şi se întîlneşte în stare liberă numai în unele plante.

Ornitina îndeplineşte în organismul păsărilor un rol extrem de important, reacţionînd cu acidul benzoic cu formare de *acid ornituric*.

1.2. AMINOACIZI CICLICI

1.2.1 Aminoacizi aromatici

L-Fenilalanina (acidul β-fenil-α-aminopropionic) a fost izolată pentru prima dată în anul 1879 din plantele de lupin şi ulterior obţinută în laborator. Este un aminoacid *esenţial* şi rezultă în cantităţi relativ mici după hidroliza tuturor proteinelor. În proteinele animale şi vegetale se întîlneşte numai forma *L* a aminoacidului. Forma *D* a fenilalaninei a fost identificată în structura unor peptide naturale : *tirocidina*, *gramicidina S* şi *bacitracina A*.

Tirozina (p-hidroxifenilalanina) izolată în anul 1846 de L i e b i g din hidrolizatele alcaline ale cazeinei este, de asemenea, un *aminoacid esenţial* a cărui carenţă în organism provoacă grave tulburări metabolice.

Tirozina este un aminoacid greu solubil în apă, proprietate utilizată în laborator în scopul separării ei din hidrolizatele proteinelor. *O-sulfatul de tirozină* este prezent în moleculele de fibrinogen şi în molecula *gastrinei*, în timp ce alţi derivaţi naturali ai tirozinei *(3-bromtirozina, 3-monoiodtirozina, 3,5-diiodtirozina)* au fost semnalaţi în proteina tiroidiană *tiroglobulina*. Tirozina este precursorul unor compuşi importanţi din punct de vedere metabolic şi biologic : *adrenalina*, *tiroxina*, *tiramina*, *acidul homogentizinic*, *acidul gorgonic*, *pigmenţii melanici* etc.

1.3. AMINOACIZI HETEROCICLICI

L-Triptofanul (acidul β-indolil-α-aminopropionic) a fost izolat în 1901 de către H o p k i n s şi C o l e din produsele de degradare ale cazeinei rezultate sub influenţa sucului pancreatic. Acest aminoacid esenţial se găseşte în majoritatea proteinelor naturale, însă în cantităţi relativ mici. Hidroliza acidă a preparatelor proteice este însoţită de degradarea totală a triptofanului.

În procesul digestiei, sub acţiunea florei bacteriene, triptofanul este degradat cu formare de *indol* şi *scatol*, iar prin decarboxilare, trece în amina corespunzătoare denumită *triptamină* (p. 27) Triptofanul în mediu de acid acetic glacial şi în prezenţa acidului sulfuric concentrat, formează o coloraţie violetă caracteristică, în prezenţa acidului glioxilic, care se găseşte sub formă de urme în acidul acetic glacial.

L-Histidina (acidul β-imidazolil-α-aminopropionic) este un acid diaminomonocarboxilic heterociclic, care a fost izolat în 1896 din hidrolizatele acide ale protaminei prezente în sperma sturionilor.

Histidina este prezentă în cantităţi relativ mari în hemoglobină; ea intră în compoziţia *ergotioneinei* (sub formă de tiolhistidină), *carnozinei* şi *anserinei*. Prin decarboxilarea histidinei rezultă o amină : *histamina*. Histidina a fost izolată din ficat, sînge, plămîni, leucocite etc.

3-Metilhistidina a fost identificată în miozină, actină și în histone, în timp ce derivatul fosforilat N-fosfohistidina a fost găsită în histone și în structura unor enzime, de exemplu, succinat tiokinaza și nucleozid difosfat kinaza.

L-Prolina (acidul pirolidin-α-carboxilic) a fost izolată de către E. Fischer din hidrolizatele de cazeină sub formă de *L-prolină* și *DL--prolină*. Se găsește în majoritatea proteinelor, în cantități mari, îndeosebi în colagen, gelatină, în proteinele gramineelor și în alte proteine.

O proprietate particulară a L-prolinei este solubilitatea ei în alcool, proprietate caracteristică și proteinelor care conțin prolină în cantități mari.

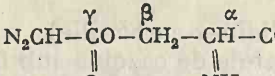
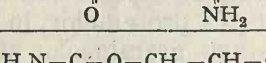
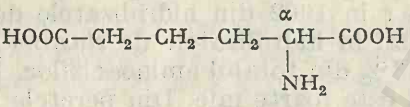
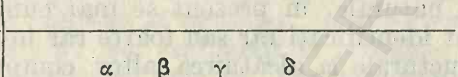
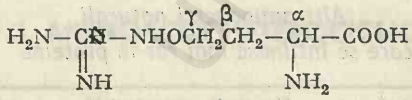
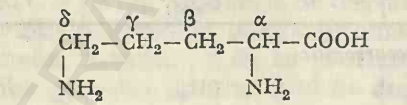
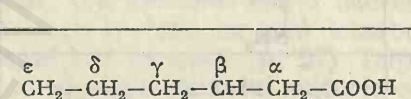
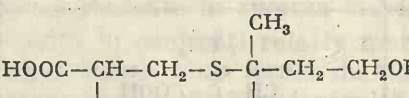
4-Hidroxi-L-prolina (acidul β-hidroxipirolidin-α-carboxilic) a fost izolată de E. Fischer în 1902 din hidrolizatele de *gelatină*. Ulterior, a fost identificată numai în hidrolizatele de *elastină* și *colagen* în care formează aproximativ 13% din totalul aminoacizilor. În alte proteine conținutul hidroxiprolinei este foarte mic. Din peretele celular al diatomeelor a fost izolată 3,4-*dihidroxivrolina*.

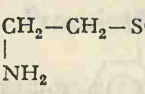
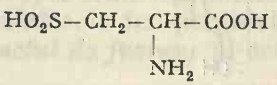
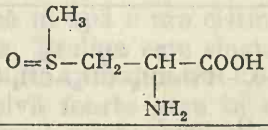
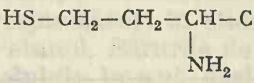
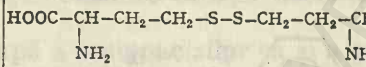
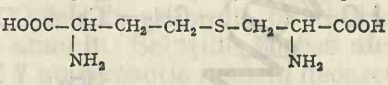
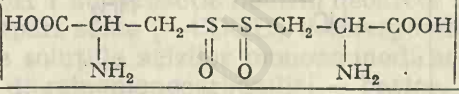
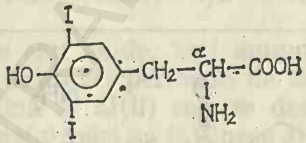
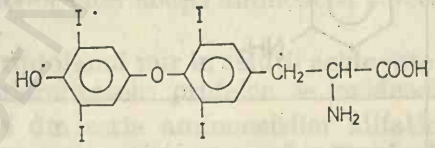
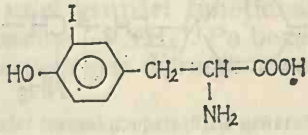
Pe lîngă aminoacizii descriși și care au fost identificați frecvent în compoziția proteinelor naturale, în prezent se mai cunosc și alți numeroși aminoacizi care sînt identificați rar sau foarte rar în proteine, însă participă ca unități structurale la alcătuirea altor compuși organici sau se întîlnesc în organismele animale și vegetale în stare liberă ca produși ai metabolismului intermediar. Dintre aceștia cei mai importanți sînt redați în tabelul 1.3.

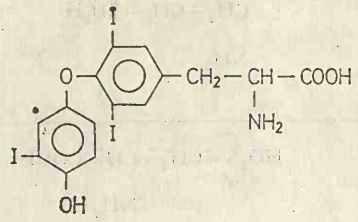
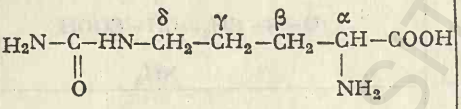
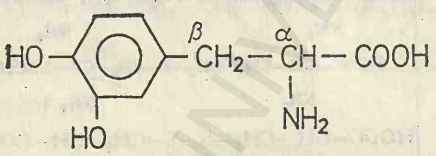
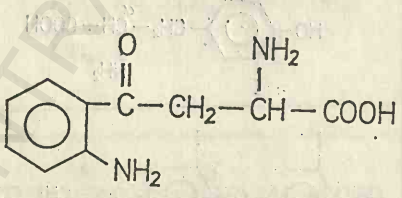
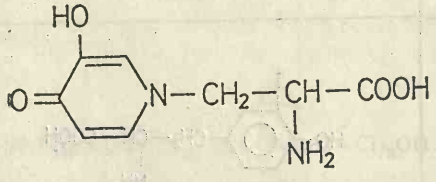
TABELUL 1.3

Alți aminoacizi naturali, care se întîlnesc mai rar în proteine

Denumirea aminoacidului	Formula structurală	Răspîndire și rol biologic
1	2	3
1. *Acizi monoaminomonocarboxilici*		
Acidul β-aminoizobutiric	$CH_3-CH(NH_2)-CH_2-COOH$	Descoperit cu ajutorul metodei cromatografice în urina umană și izolat în stare cristalizată.
L-Homoserina sau acidul α-amino-γ-hidroxibutiric	$HO-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$	Izolat sub formă de lactonă prin cromatografia pe hîrtie a extractelor *de Pisum sativum*. Este un produs intermediar al metabolismului metioninei, treoninei și acidului aspartic.
α-Metil-D-serina sau *acidul α-amino-β-hidroxiizobutiric*	$HO-CH_2-C(CH_3)(NH_2)-COOH$	A fost izolat din antibioticul denumit *amicetină* și s-a demonstrat că are o configurație *D*.

1	2	3
L-Azaserina (O-diazo-acetil-L-serina)		*L*-Azaserina a fost izolată din filtratul culturilor de *Streptomyces*
O-Carbamil-D-serina		Izolată dintr-o tulpină de *Streptomyces*
2. *Acizimonaminodicarboxilici*		
Acidul L-α-aminoadipic		Depistat într-o proteină hidrosolubilă izolată din mays. În stare liberă se găsește în semințele de porumb și în miceliile de *Aspergillus oryzae*. Constituie un produs al metabolismului lizinei, care este eliminat pe cale urinară.
L-Teanina sau acidul δ-etilamid-L-glutamic		A fost izolat din frunzele de ceai verde japonez.
3. *Acizi diaminomonocarboxilici*		
L-Canavanina sau acidul α-amino-γ-guanidin-hidroxibutiric		Se găsește în stare liberă în făina de soia și în boabele de *Canavalia*. Inhibă creșterea unor microorganisme.
L-Ornitina sau acidul α, δ-diaminovalerianic		Se întîlnește în stare liberă în plante. În organismul animal se formează în ciclul urogenetic. Dibenzoilornitina sau acidul ornituric se găsește în urina păsărilor.
β-Lizina sau acidul β,ε-diaminocapronic		A fost separată din antibiotice: *viomicina*, *streptomicina* și *streptolina*.
4. *Aminoacizi care conțin sulf*		
Felinina		Izolată pe cale cromatografică din urina de pisică, în care este excretată în cantități relativ mari (120 mg/zi)

1	2	3
Taurina sau acidul 2-aminoetansulfonic		Se întîlnește în stare liberă în țesuturile vegetale și animale. Sub formă de *acid taurocolic* intră în compoziția bilei.
Acidul β-sulfinil-α-aminopropionic		Acidul cisteinsulfinic și produsul lui de decarboxilare — *hipotaurina* — se întîlnește în stare liberă în creierul de pisică.
(+)-S-metil-L-cistein-sulfoxid		A fost izolat din varză și din ridichi
L-Homocisteina		Acești aminoacizi care conțin sulf au fost izolați din diferite surse biologice, însă nu au fost obținuți prin metode preparative.
L-Homocistina		
L-Cistationina		
Cistindisulfoxid		
5. *Aminoacizi care conțin halogeni*		
3,5-Diiod-L-tirozina		A fost depistat la unele organisme marine și izolat din glanda tiroidă.
Tiroxina sau 3,5,3',5'-tetraiodtironina		Acest aminoacid intră în compoziția proteinelor glandei tiroide
Monoiodtirozina		Separată pe cale cromatografică din hidrolizatele glandei tiroide. A fost depistată și la stelele de mare. Reprezintă, probabil, un produs de degradare al diiodtirozinei

1	2	3
3,3'5-Triiodtironina		Aminoacid separat din glanda tiroidă a bovinelor. A fost, de asemenea, depistat în hidrolizatele rezultate după acțiunea tripsinei asupra glandei tiroide a șobolanilor care au primit ^{131}I. Se întîlnește în organism în stare liberă.
6. *Alți aminoacizi*		
Citrulina sau acidul α-amino-δ-carbamido-valerianic.		Depistată pentru prima dată în sucul de pepene ea a fost izolată ulterior și din alte plante și din țesuturile animale. Participă în ciclul urogenetic
3,4-Dioxifenil-L-alanina (DOPA)		Reprezintă un produs intermediar în formarea *melaninelor* și, posibil, și în alte procese metabolice. A fost izolată din extractele unor plante în care se găsește ca produs al oxidării tirozinei. Nu s-a putut depista prezența DOPA în hidrolizatele proteinelor.
L-Kinurenina sau acidul β-antraniloil-α-amino propionic		A fost izolată din urina de iepure după hrănirea animalului cu doze mari de triptofan și reprezintă un produs intermediar a metabolismului triptofanului în organism.
Mimozina		Mimozina este cunoscută și sub denumirea de *leucenină* și a fost izolată din *Leucaena glauca* și *Mimosa pudica*. Are o acțiune toxică asupra organismelor animale, însă este ineficace asupra rumegătoarelor.

1.4. PROPRIETĂȚI GENERALE ALE AMINOACIZILOR *

1.4.1 Proprietăți fizice

Aminoacizii care se întîlnesc în structura proteinelor native au fost izolați sub formă de substanțe *incolore*, *cristalizate*, *stabile în stare solidă* și la temperatura obișnuită (25°C). Forma cristalelor este caracteristică pentru fiecare aminoacid. Prin încălzire, la temperaturi moderate, aminoacizii se *topesc cu descompunere*, *punctul de fuziune* al cristalelor neconstituind un criteriu de diferențiere.

Aminoacizii sînt substanțe solubile în apă însă, gradul de solubilitate este diferit de la un aminoacid la altul.

Solubilitatea cea mai mică în apă o are cistina și tirozina, iar cea mai mare — prolina și oxiprolina. Prolina este singurul aminoacid cu o solubilitate bună în alcool (la 20°C aproximativ 1,6 g la 100 ml) în timp ce restul aminoacizilor se dizolvă foarte greu în alcool.

Clorhidrații și diclorhidrații aminoacizilor sînt mult mai solubili în apă decît aminoacizii corespunzători în stare liberă; majoritatea clorhidraților sînt solubili și în etanol. Sărurile de sodiu ale aminoacizilor sînt, de asemenea, mai ușor solubile în apă decît aminoacizii liberi din care acestea provin.

Solubilitatea în apă a aminoacizilor ca și a proteinelor este influențată de prezența sărurilor. Astfel, de exemplu, cisteina se dizolvă mai bine în prezența sulfatului de amoniu. Soluțiile apoase ale acizilor monoaminomonocarboxilici, la *p*H 7 au o reacție neutră, deoarece în molecula aminoacidului, fiecărei grupări acide (—COOH) îi corespunde o grupare bazică ($—NH_2$), în timp ce soluțiile acizilor monoaminodicarboxilici sînt acide, iar cele ale acizilor diaminomonocarboxilici — bazice. De regulă, aminoacizii sînt stabili în soluții apoase și încălzirea acestora în autoclave la o temperatură de 100—200 °C în decurs de 1/2—2 ore, nu determină descompunerea lor.

În soluții slab alcaline sau acide, toți aminoacizii sînt ușor solubili. Cu toate acestea, după o anumită perioadă de timp unii aminoacizi sînt oxidați (triptofanul, cisteina și alții) sau se descompun parțial (serina, treonina etc.). Aceste transformări se întîlnesc și în cazul hidrolizei acide sau alcaline a proteinelor cînd acești aminoacizi suferă modificări chimice sau sînt racemizați.

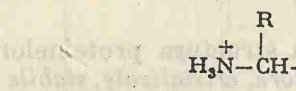
De remarcat, că triptofanul pur în soluții acide este stabil, în timp ce în amestecuri sau în hidrolizatele proteice se oxidează.

Termenii inferiori din seria aminoacizilor alifatici sînt substanțe *cu gust dulceag* în timp ce *aminoacizii cu masă moleculară mare au gust amar.*

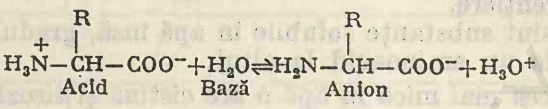
Aminoacizii sînt substanțe cu *caracter amfoter* datorită prezenței concomitente în moleculă a unei grupări funcționale acide (—COOH) și a unei grupări funcționale bazice ($—NH_2$). Pe baza determinării distanțelor interatomice cu ajutorul *metodei de difracție a razelor X* (în molecula gli-

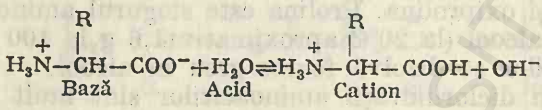
* În acest capitol vor fi descrise numai proprietățile generale ale aminoacizilor care prezintă importanță biochimică.

cocolului cristalizat), a constantelor de aciditate şi bazicitate, a momentelor dielectrice precum şi a interpretării *spectrelor* Raman s-a ajuns la concluzia că moleculele aminoacizilor au structura unor *amfioni bipolari* de forma :



Amfionul bipolar poate funcţiona ca acid sau ca bază (conform teoriei lui Brönsted), atît în prezenţa apei, care la rîndul ei se comportă ca acid sau ca bază, cît şi în prezenţa acizilor sau bazelor propriu-zise :





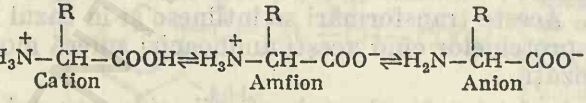
Cele două constante de ionizare, acidă (K_a) şi bazică (K_b), se referă în primul caz la aciditatea ionului $R-\overset{+}{N}H_3$ iar în al doilea caz la bazicitatea ionului $RCOO^-$, şi sînt date de relaţiile :

$$K_a = \frac{[H_3O^+][H_2N-CHR-COO^-]}{[\overset{+}{H_3N}-CHR-COO^-]};$$

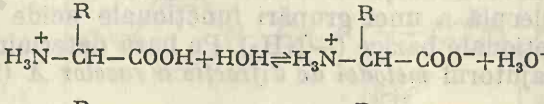
$$K_b = \frac{[\overset{+}{H_3N}-CHR-COOH][OH^-]}{[\overset{+}{H_3N}-CHR-COO^-]}.$$

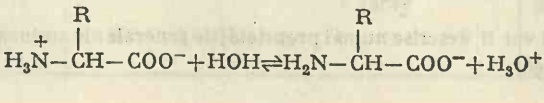
În cele două relaţii s-a neglijat variaţia extrem de mică a concentraţiei apei, considerîndu-se constantă.

În soluţie apoasă există deci în permanenţă un echilibru între cei trei ioni :



Conform teoriei lui Brönsted cationul reprezintă un acid bibazic (cu gruparea funcţională $-COOH$ mai acidă decît $-\overset{+}{N}H_3$), a cărui ionizare are loc în două trepte :





Valoarea constantelor de ionizare este dată, conform legii acțiunii maselor, de relațiile :

$$K_1 = \frac{[H_3\overset{+}{N}-CHR-COO^-][H_3O^+]}{[H_3\overset{+}{N}-CHR-COOH]},$$

$$K_2 = \frac{[H_2N-CHR-COO^-][H_3O^+]}{[H_3\overset{+}{N}-CHR-COO^-]},$$

în care variația extrem de mică a concentrației apei este considerată neglijabilă.

Existența ionului bipolar explică utilizarea aminoacizilor pentru prepararea soluțiilor tampon :

$$H_3\overset{+}{N}-\underset{R}{CH}-COO^- + (Cl^-) + H_3O^+ \rightleftharpoons H_3\overset{+}{N}-\underset{R}{CH}-COOH + H_2O + (Cl^-)$$

Bază tare — *Acid tare* — *Acid slab* — *Bază slabă*

$$H_3\overset{+}{N}-\underset{R}{CH}-COO^- + (Na^+) + OH^- \rightleftharpoons H_2N-\underset{R}{CH}-COO^- + H_2O + (Na^+)$$

Acid tare — *Bază tare* — *Bază slabă* — *Acid slab*

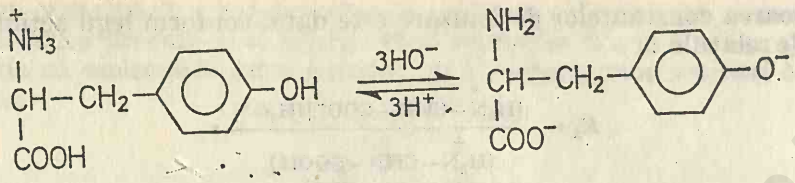
Dacă la soluția aminoacidului se adaugă un acid tare, de exemplu HCl, protonii săi sînt consumați dînd naștere unui acid slab, iar dacă se adaugă o bază tare, de exemplu NaOH, ionii hidroxil sînt consumați concomitent cu formarea unei baze slabe. În acest mod *p*H soluției nu variază apreciabil, aminoacidul îndeplinîndu-și rolul de „soluție tampon".

Deoarece în soluție acidă aminoacizii se găsesc sub formă de cationi, ei vor migra în cursul electrolizei spre anod, iar în soluție bazică vor migra spre catod. Amfionul bipolar fiind atras în mod egal spre anod și catod, nu migrează în cîmp electric.

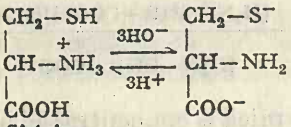
O situație specială o prezintă acizii monoaminodicarboxilici, diaminomonocarboxilici și aminoacizii care au în structura lor și alte grupări ionizabile decît carboxil și amino, care în soluții acide sau bazice disociază diferit. Pornind de la formele total protonate acești aminoacizi disociază după cum urmează :

$$H_3\overset{+}{N}-\underset{COOH}{\overset{R}{\underset{|}{C}}}-COOH \underset{3H^+}{\overset{3HO^-}{\rightleftharpoons}} H_2N-\underset{COO^-}{\overset{R}{\underset{|}{C}}}-COO^- + 3\,H_2O$$

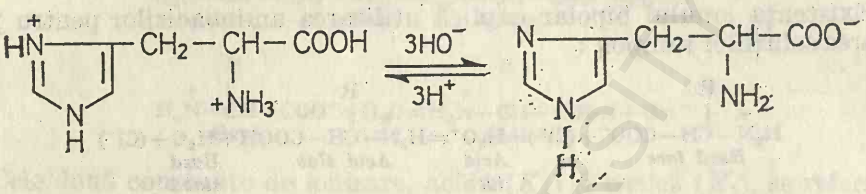
$$HOOC-\underset{+NH_3}{\overset{R}{\underset{|}{C}}}-\overset{+}{N}H_3 \underset{3H^+}{\overset{3HO^-}{\rightleftharpoons}} -OOC-\underset{NH_2}{\overset{R}{\underset{|}{C}}}-NH_2 + 3H_2O$$



Tirozina



Cisteina



Histidina

În ultimul caz, numai perechea de electroni neparticipanți ai N din poziția 3 poate accepta un proton.

În strînsă legătură cu caracterul amfoter al aminoacizilor, de o deosebită importanță apare noțiunea de *p*H *izoelectric*(pH_i) sau *punct izoelectric*, noțiune definită ca *p*H la care un aminoacid este ionizat în aceeași măsură ca acid și ca bază sau cu alte cuvinte *p*H la care soluția apoasă a unui aminoacid conține anioni și cationi (ai aminoacidului) în proporție egală.

Din valoarea constantelor de ionizare K_1 și K_2 se pot scoate valorile concentrației anionului și cationului :

$$[\overset{+}{H_3N}-CHR-COOH] = \frac{[\overset{+}{H_3N}-CHR-COO^-][H^+]}{K_1},$$

$$[H_2N-CHR-COO^-] = \frac{[\overset{+}{H_3N}-CHR-COO^-]\,K_2}{[H^+]},$$

Pentru că la pH_i concentrația anionilor trebuie să fie egală cu a cationilor, rezultă că :

$$\frac{[\overset{+}{H_3N}-CHR-COO^-][H^+]}{K_1} = \frac{[\overset{+}{H_3N}-CHR-COO^-]K_2}{[H^+]}.$$

Așadar, concentrația ionilor de hidrogen pentru *p*H izoelectric e dată de relația :

$$[H^+]_i^2 = K_1 \cdot K_2 \text{ sau } [H^+]_i = \sqrt{K_1 K_2}.$$

Prin logaritmare se obține tocmai valoarea pH_i :

$$-\lg[H]_i = \frac{1}{2}(-\lg K_1 - \lg K_2),$$

$$pH_i = -\frac{pK_1 + pK_2}{2}$$

Valoarea pH izoelectric este așadar legată de valoarea constantelor de ionizare K_1 și K_2 printr-o relație simplă în care pK_1 și pK_2 poartă numele de *exponenți de aciditate.* Așa după cum se observă, K_1 reprezintă constanta de ionizare pentru funcțiunea carboxil, iar K_2 — constanta de ionizare pentru funcțiunea amino. Valorile exponenților de aciditate pK_1 și pK_2 pot fi determinate titrimetric prin stabilirea unor echivalențe între cantitățile de HCl și NaOH necesare aducerii soluției unui aminoacid la toate valorile de pH (1—14). În *figura 1.1* prezentăm curba de titrare a glicocolului care permite determinarea experimentală a pH izoelectric ($pH_i = 6{,}1$). *Valoarea pK_1 reprezintă pH soluției,* obținut după consumarea a 0,5 echivalenți HCl *cînd jumătate din cantitatea aminoacidului se află în stare de anion ($R-COO^-$), cealaltă jumătate fiind încă neionizată.* pK_2 reprezintă pH soluției de glicocol obținut prin titrare cu 0,5 echivalenți NaOH ($^1/_2$ din aminoacid se află ca $R-\overset{+}{N}H_3$, $^1/_2$ se află în formă $R-NH_2$).

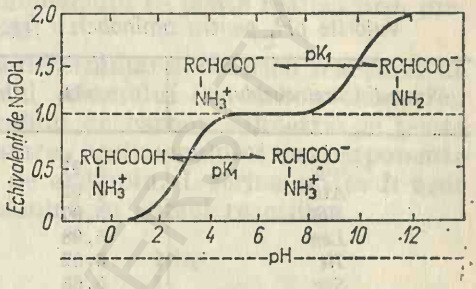


Fig. 1.1. — Curba de titrare a glicocolului

Prin logaritmarea relației rezultă într-adevăr că atunci cînd raportul concentrațiilor $[H_3\overset{+}{N}-CHR-COO^-]/[H_3\overset{+}{N}-CHR-COOH]$ este egal cu unitatea, $pK_1 = pH$:

$$\lg K_1 = \lg[H^+] + \lg \frac{[H_3\overset{+}{N}-CHR-COO^-]}{[H_3\overset{+}{N}-CHR-COOH]},$$

știind că — $[\lg H^+] = pH$ și analog $-\lg K_1 = pK_1$, rezultă :

$$pK_1 = pH - \lg \frac{[H_3\overset{+}{N}-CHR-COO^-]}{[H_3\overset{+}{N}-CHR-COOH]},$$

deci : $pK_1 = pH$ cînd $[H_3\overset{+}{N}-CHR-COO^-] = [H_3\overset{+}{N}-CHR-COOH]$.

Fiecare aminoacid este caracterizat prin propriul său pH izoelectric, pH la care aminoacidul nu migrează în soluție sub influența cîmpului electric.

Revenind la echilibrul :

$$\underset{II}{H_2N-CHR-COO^-} \underset{OH^-}{\overset{H^+}{\rightleftharpoons}} \underset{I}{H_3\overset{+}{N}-CHR-COO^-} \underset{OH^-}{\overset{H^+}{\rightleftharpoons}} \underset{III}{H_3\overset{+}{N}-CHR-COOH}$$

se observă într-adevăr că în soluție alcalină sînt excedentari anionii II și va avea loc o migrare netă către catod, pe cînd în soluție acidă predomină cationii III, în consecință aminoacidul migrează spre anod.

Punctul izoelectric al aminoacizilor monoaminomonocarboxilici este situat în vecinătatea *p*H neutru, fiind însă întotdeauna sub 7, datorită faptului că gruparea carboxil este mai puternic ionizată decît gruparea amino. Glicocolul, spre exemplu, are valoarea $K_a = 1{,}6 \cdot 10^{-11}$ și $K_b = 2{,}5 \cdot 10^{-12}$, solvirea lui în apă punînd în libertate mai mulți anioni $H_2N-CH_2-COO^-$ decît cationi $H_3\overset{+}{N}-CH_2-COOH$. Pentru aminoacizii monoaminodicarboxilici pH_i se află în mediu puternic acid, iar pentru aminoacizii diaminomonocarboxilici în mediu bazic (tabelul 1.4).

TABELUL 1.4

Valorile pH_i pentru aminoacizii frecvent întîlniți în structura proteinelor

Simbolul aminoacidului	pH_i	*Simbolul aminoacidului*	pH_i
Gly	5,97	*Glu*	3,22
Ala	6,02	*Lys*	9,74
Val	5,97	*His*	9,15
Leu	5,98	*Arg*	10,76
Ile	6,02	*Phe*	5,98
Ser	5,68	*Tyr*	5,65
Thr	6,53	*Trp*	5,88
Asp	2,87	*Cys*	5,06
Asn	5,41	*Met*	5,75
Gln	5,65	*Pro*	6,10

La *p*H izoelectric solubilitatea aminoacizilor este minimă datorită faptului că dipolmomentul mare al amfionului duce la o puternică atracție între molecule. Pe măsură ce *p*H devine mai acid sau mai alcalin iau naștere cantități mai mari de cationi sau anioni mai solubili decît amfionul.

Punctul izoelectric al aminoacizilor variază în funcție de raportul dintre numărul grupărilor amino și carboxil din moleculă. Astfel, de exemplu, acizii aspartic și glutamic, care fac parte din grupa acizilor monoaminodicarboxilici au pH_i la *p*H = 3,0—3,2, în timp ce arginina și lizina — doi acizi diaminomonocarboxilici — au un pH_i situat la *p*H 9,76 și respectiv 9,74.

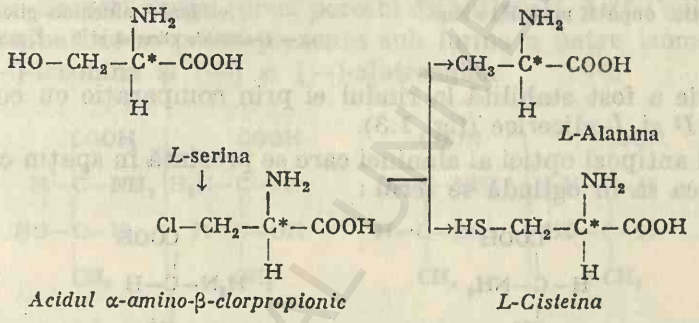
Valoarea punctului izoelectric este condiționată de mărimea valorilor constantelor de disociere — acide și bazice — ale aminoacidului respectiv. În punctul izoelectric, sarcina globală netă este nulă deoarece suma sarcinilor pozitive este egală cu suma sarcinilor negative.

Toți aminoacizii, cu excepția glicocolului, sînt substanțe optic active deoarece prezintă în structura lor un α atom de carbon asimetric, putînd exista sub forma celor doi izomeri optici: dextrogir (+), levogir (—) sau a amestecului lor racemic (±). Există și aminoacizi care conțin doi atomi de carbon asimetrici (treonina, izoleucina, hidroxilizina, hidroxiprolina) și în consecință pot prezenta patru izomeri optici (două perechi de antipozi). Măsurînd rotațiile specifice, la pH 7, pentru o serie de aminoacizi izolați

în urma hidrolizei totale a unor proteine s-a constatat că resturile de alanină, izoleucină și acid glutamic sînt dextrogire (+) rotind planul luminii polarizate spre dreapta, în timp ce resturile de leucină, fenilalanină și triptofan au proprietăți levogire (—). Direcția și mărimea rotației optice a aminoacizilor depinde de natura chimică a radicalului *R* și de *p*H soluției.

Stereochimia aminoacizilor care intră în structura proteinelor native este stabilită în raport cu configurația L-gliceraldehidei. Pentru evitarea oricăror confuzii, trebuie subliniat că simbolurile *D* și *L* nu se referă la direcția rotației luminii plan-polarizate. Deși izomerii geometrici *D* ai aminoacizilor nu apar în proteine, ei sînt prezenți în țesuturile vii, în special în calitate de constituenți ai peretelui celulei bacteriene. Este surprinzător faptul că proteinele conțin în general aceiași 20 de aminoacizi din seria *L*. Stabilirea seriei din care face parte aminoacidul se poate realiza prin metode fizico-chimice, chimice și biologice.

La baza *metodelor fizico-chimice* stă determinarea cineticii reacțiilor de substituție care se realizează la nivelul atomului de carbon asimetric. Configurația moleculei la nivelul atomului de carbon asimetric se poate determina pe cale chimică prin compararea aminoacidului cu componente de configurație bine stabilită. Astfel, de exemplu, L-serina poate fi ușor transformată în L-cisteină sau în L-alanină în cursul reacțiilor.



Deoarece în cursul acestor transformări centrul asimetric al moleculei, reprezentat de atomul de carbon asimetric (C*) nu participă la reacție și nu își schimbă configurația, cei trei aminoacizi — *L*-serina, *L*-alanina și *L*-cisteina — au o configurație sterică identică.

În cazul cînd are loc o reacție de substituție la atomul de carbon asimetric se poate provoca inversarea configurației sterice iar stabilirea acesteia este necesar să se realizeze cu ajutorul unei alte metode.

Metoda biologică este foarte sensibilă și exactă și se bazează pe specificitatea de acțiune a unei enzime de a ataca substratul care posedă o anumită configurație *D* sau *L*.

Emil Fischer propune următoarea convenție pentru reprezentarea stereochimiei moleculelor organice : într-o primă dimensiune în planul hîrtiei sînt situate în linie dreaptă grupările a căror poziție se modifică în funcție de izomerul geometric *D* sau *L* (H și NH_2) și în a doua dimensiune,

---

* Analiza roentgenostructurală a configurațiilor unor compuși analizați de E. Fischer a demonstrat corespondența totală dintre ipoteză și realitate.

perpendiculară pe prima, gruparea COOH cu orientarea în sus și gruparea R cu orientarea în jos. Prin urmare izomerul stereochimic *L*, va fi reprezentat cu gruparea amino spre stînga și cu hidrogenul spre dreapta (fig. 1.2).

Stabilirea configurației aminoacizilor s-a făcut prin utilizarea *metodei corelației sterice*, adică prin compararea lor cu acidul lactic *D* și *L*, a cărui

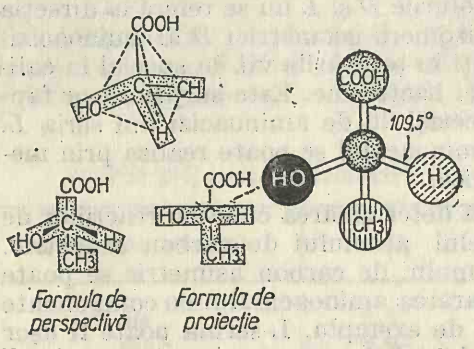


Fig. 1.2. — Reprezentarea grafică a formulelor de perspectivă și de proiecție ale acidului *L*-lactic, după E m i l F i s c h e r.

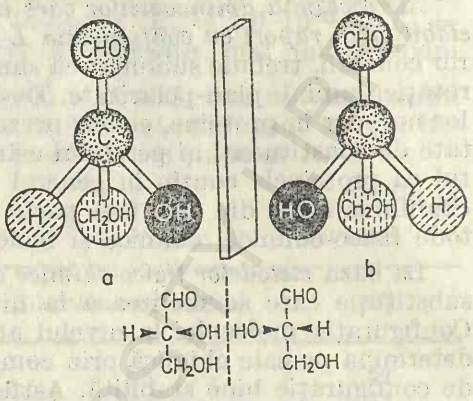


Fig. 1.3. — Stabilirea apartenenței aminoacizilor la scria sterică *L* și *D*, utilizînd ca etalon — aldehida glicerică:
a — *D*-aldehida glicerică și b — *L*-aldehida glicerică

configurație a fost stabilită la rîndul ei prin comparație cu configurația aldehidei *D* și *L*-glicerice (fig. 1.3).

Cei doi antipozi optici ai alaninei care se prezintă în spațiu ca obiectul cu imaginea sa în oglindă se scriu :

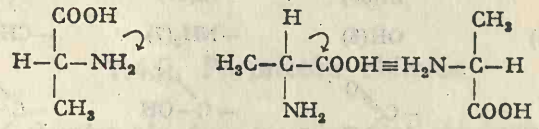
În ceea ce privește sensul rotației planului luminii polarizate, s-a constatat experimental că alanina care face parte din seria *D* rotește planul de vibrație al luminii polarizate la stînga (—), iar *L*-alanina îl rotește spre dreapta (+). Alanina naturală aparține seriei sterice *L*.

Configurația aminoacizilor are o deosebită semnificație biologică, deoarece organismele superioare pot asimila aproape în exclusivitate aminoacizi, aparținînd seriei *L* pentru care sistemele enzimatice posedă specificitate de substrat *.

În legătură cu modul de scriere a aminoacizilor (și al tuturor substanțelor conținînd atomi de carbon asimetrici) trebuie remarcat faptul că formulele de proiecție folosite în mod uzual pot fi rotite doar în planul hîrtiei

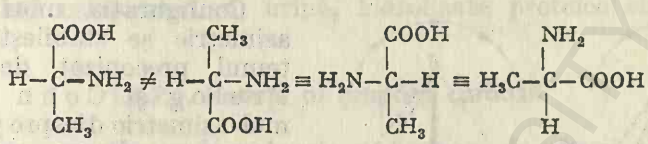
* În hidrolizatele polipeptidelor cu acțiune antibiotică, de exemplu, gramicidina și al proteinelor izolate din tumorile maligne, au fost identificați aminoacizi aparținînd seriei *D*. Cel mai important aminoacid natural din seria *D* este acidul *D*-glutamic.

pentru a-şi păstra individualitatea. Rotirea formulei *D*-alaninei în plan, cu 90° sau 180°, nu îi modifică semnificaţia:



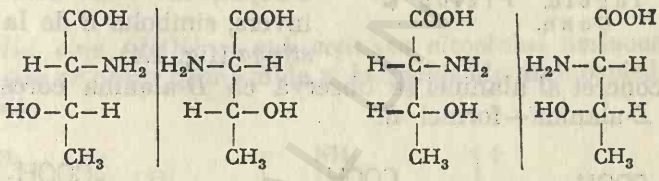
D(−)-*Alanina*

pe cînd rotirea în afara planului cu 180° face ca noua formulă să înfăţişeze antipodul reprezentat de prima, adică *L* (+)-alanina.



D(−)-*Alanina* *L*(+)-*Alanina*

Aminoacizii cu doi atomi de carbon asimetrici se pot prezenta sub forma a patru izomeri optici (două perechi de antipozi). Astfel acidul α-amino β-hidroxibutiric se poate prezenta sub forma a patru izomeri optici: (+) şi (−)-treonina şi (+) şi (−)-alotreonina.



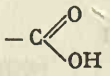
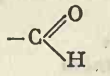
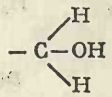
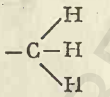
D(+)-Treonina *L*(−)-Treonina *D*(+)-Alotreonina *L*(−)-Alotreonina

Antipozi optici Antipozi optici

D(+)-treonina şi *L*(−)-treonina sînt diastereoizomeri ai celor două alotreonine.

Pentru a pune capăt unor ambiguităţi create de utilizarea sistemului de nomenclatură *D* şi *L*, Ingold, Prelog şi Cohn (1966) au propus un sistem complet diferit de denumire şi clasificare a substanţelor optic active, care ţine seama de configuraţia absolută a fiecărui atom asimetric şi permite menţionarea acesteia în însăşi denumirea substanţei. Sistemul constă în *atribuirea unei ordini de prioritate substituenţilor* legaţi de atomul asimetric. Ordinea de prioritate este dată de numărul de ordine *Z* al atomilor legaţi de centrul de asimetrie *acordîndu-se prioritate celui cu număr de ordine mai mare.* Dacă doi substituenţi se leagă de atomul asimetric prin atomi identici prioritatea se stabileşte de cel de-al doilea atom al substituentului sau de următorul în caz de egalitate. Cîteva exemple de ordine

de prioritate descrescătoare pentru o anumită serie de substituenţi sînt edificatoare :

I(53)	Br(35)	Cl(17)	F(9)
$-SH_2(16)$	OH(8)	$-NH_2(7)$	$-CH_3(6)$
			
(6) 24	(6) 17	(6) 10	(6) 3
(3×8)	(2×8)+1	8 + (2×1)	3×1

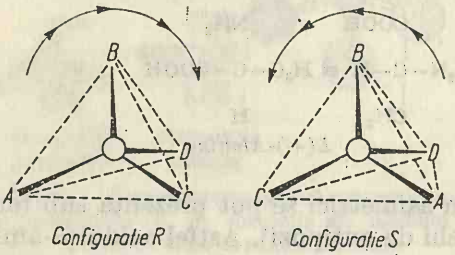
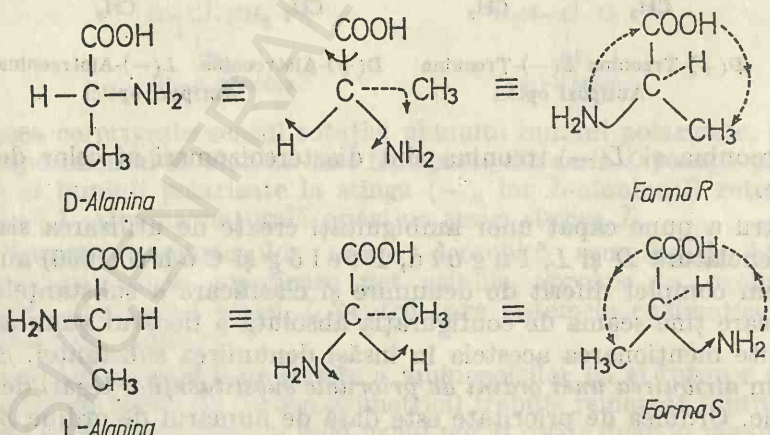


Fig. 1.4. — Sistemul de notare *R* şi *S* pentru configuraţia sterică a aminoacizilor, utilizînd ordinea de prioritate a substituenţilor, după Ingold, Prelog şi Cohn.

Configuraţia unui centru de asimetrie se stabileşte după sistemul preconizat de Ingold, Prelog şi Cohn privind atomul asimetric dinspre partea opusă substituentului cu prioritatea cea mai joasă; dacă ordinea de prioritate a substituenţilor descreşte în sensul acelor ceasornicului, pentru atomul respectiv se adoptă simbolul *R*, de la *rectus* = *dreapta*, iar dacă acest sens este invers, simbolul *S* de la *sinister* = *stînga* (fig. 1.4)

În cazul concret al alaninei se observă că *D*-alanina corespunde formei, *R*, iar *L*-alanina—formei *S*.



Într-adevăr după trecerea de la formula de proiecţie la formulele de perspectivă care sînt ulterior rotite în aşa fel ca atomul de H (cu prioritatea cea mai joasă) să ajungă în partea opusă direcţiei de privire şi după

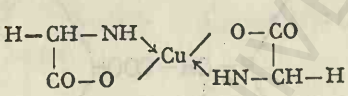
stabilirea ordinii de prioritate forma apare evidentă (pentru gruparea carboxil s-a calculat la ordinea de prioritate cifra 24 = 3 × 8 deoarece atomul de carbon se leagă prin 3 valenţe de oxigen).

1.4.2. Proprietăţi chimice

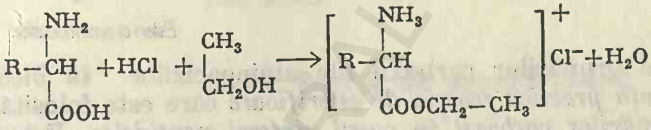
Proprietăţile chimice ale aminoacizilor sînt determinate de prezenţa grupărilor funcţionale caracteristice acestor compuşi: $-NH_2$ şi COOH. De aceea multe reacţii chimice sînt comune pentru toţi aminoacizii şi frecvent utilizate pentru determinări calitative şi cantitative ale acestora în diferite extracte, hidrolizate şi în lichidele biologice (sînge, plasmă şi ser sanguin, lichid cefalorahidian, urină, hidrolizate proteice etc.).

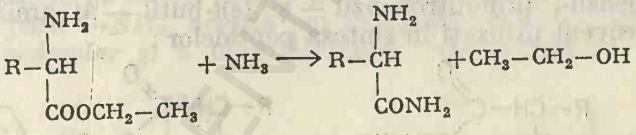
1.4.2.1. Reacţii al grupării carboxil

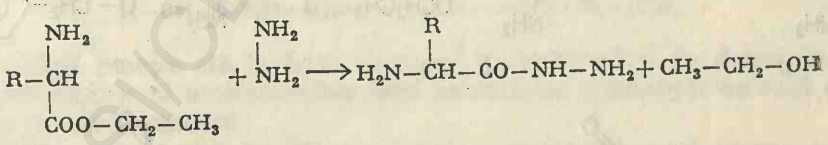
Aminoacizii reacţionează cu bazele cu formare de săruri obişnuite. În unele condiţii experimentale aminoacizii formează *săruri complexe* cu cationii metalelor grele. Glicocolul, de exemplu, în prezenţa cuprului formează complecşi intramoleculari colorați în albastru, care au structura următoare:

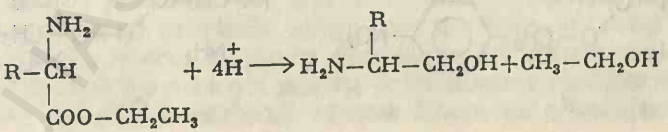


În mediu acid (HCl) şi sub acţiunea alcoolului aminoacizii formează esteri din care se obţin uşor amide şi *hidrazide* ale aminoacizilor, precum şi *amidoalcooli*:

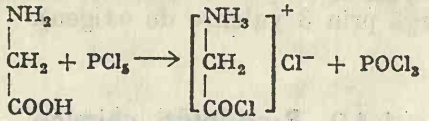




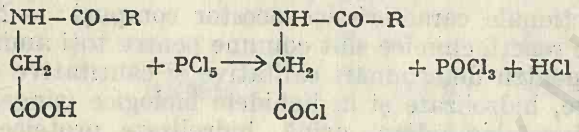




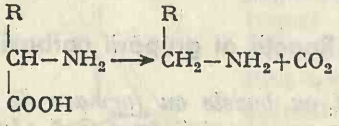
Aminoacizii reacționează cu pentaclorura de fosfor cu formare de halogenuri acide, instabile :



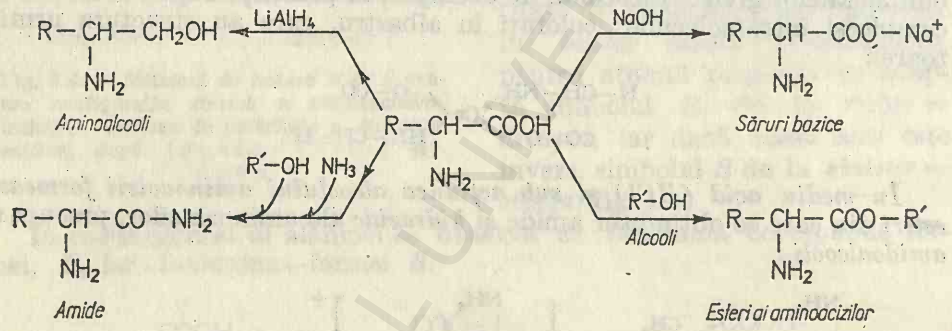
Mult mai stabile sînt halogenurile acide ale aminoacizilor acilați, care dealtfel, sînt utilizate pentru sinteza peptidelor :



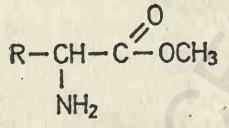
Aminoacizii pot fi decarboxilați cu formare de bioxid de carbon și amine :



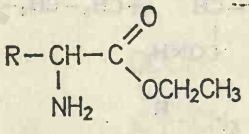
Alte reacții ale grupării carboxil sînt redate sumar în următoarea schemă :



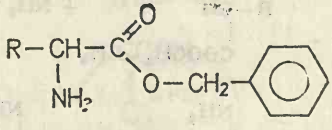
Dintre reacțiile grupărilor carboxil ale aminoacizilor *în biochimie prezintă o importanță practică reacția de esterificare* care este folosită pentru *protejarea grupărilor carboxil în cazul sintezei peptidelor.* Esterii (*a*) metil-, (*b*)etil-, (*c*)benzil-, (*d*)*p*-nitrobenzil — și (*e*)*t*-butil — ai aminoacizilor sînt cei mai frecvent utilizați în sinteza peptidelor :



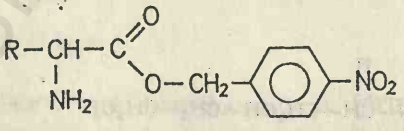
a



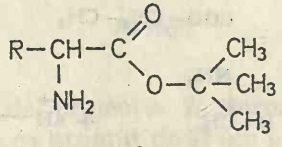
b



c



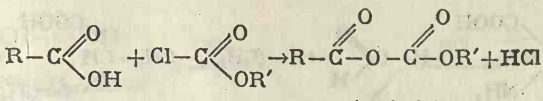
d



e

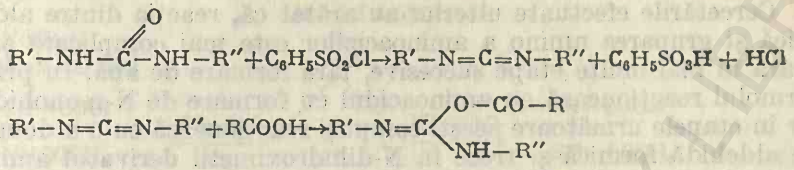
Grupările carboxil ale aminoacizilor folosiți în sinteza peptidelor *pot fi activate* printr-una din reacțiile următoare:

a.



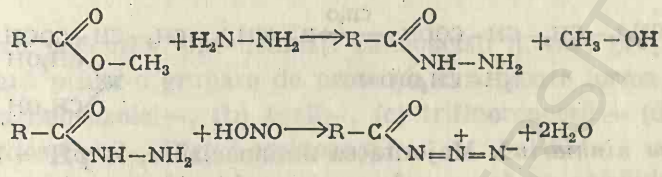
Anhidridă mixtă

b.

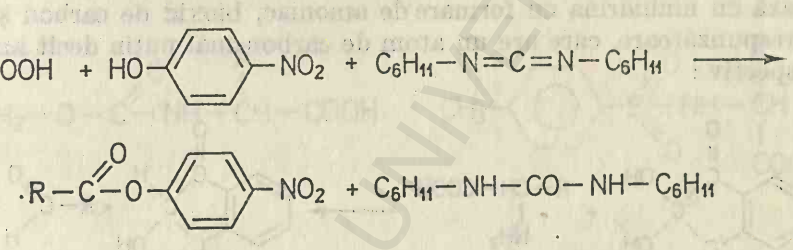


Carbodiimida

c.



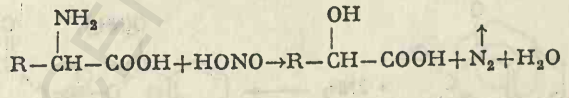
d.



Ester activat

1.4.2.2. Reacții ale grupării amino

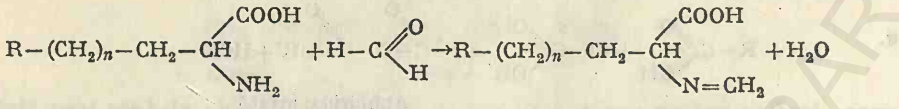
Reacția cu acidul azotos. Datorită prezenței în molecula aminoacizilor a grupării $-NH_2$, aceștia pot reacționa cu acidul azotos cu formare de *azot molecular* și a hidroxiacidului corespunzător:



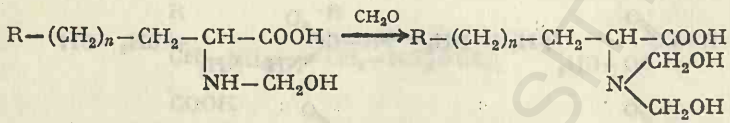
Această reacție stă la baza metodei v a n S l y k e de determinare a azotului aminic al aminoacizilor prin măsurarea volumului de azot degajat în timpul reacției.

Acțiunea formaldehidei. Formaldehida acționează rapid asupra aminoacizilor, blocînd grupările amino ale acestora, în timp ce grupările carboxil rămîn libere. Acțiunea formaldehidei asupra aminoacizilor a fost utilizată de S ö r e n s e n pentru determinarea cantitativă a acestora prin titrarea grupărilor carboxil rămase libere cu o soluție titrată de alcalii.

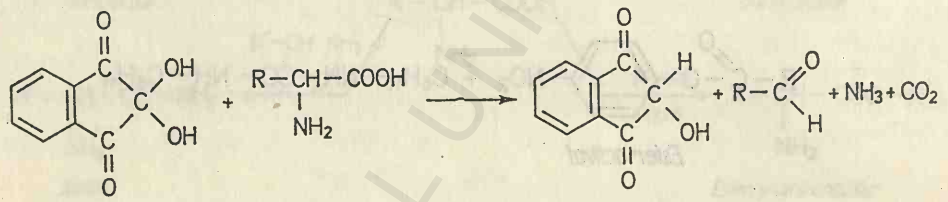
Sörensen consideră că această reacţie decurge cu formare de derivaţi metilenici — metilen aminoacizi — şi apă după schema :



Cercetările efectuate ulterior au arătat că, reacţia dintre aldehida formică şi gruparea amino a aminoacizilor este mai complicată şi se desfăşoară în mai multe etape succesive, fără formare de apă. În prima etapă, formolul reacţionează cu aminoacidul cu formare de N-monohidroximetil, iar în etapele următoare aceşti compuşi reacţionează cu o a doua moleculă de aldehidă formică şi trece în N-dihidroximetil derivatul aminoacidului respectiv :

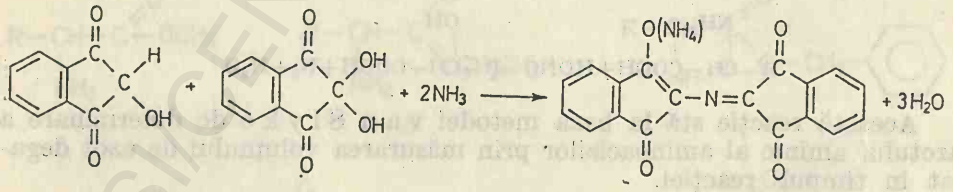


Reacţia cu ninhidrină. Majoritatea aminoacizilor, la pH = 5, reacţionează cu ninhidrina cu formare de amoniac, bioxid de carbon şi aldehida corespunzătoare, care are un atom de carbon mai puţin decît aminoacidul respectiv :



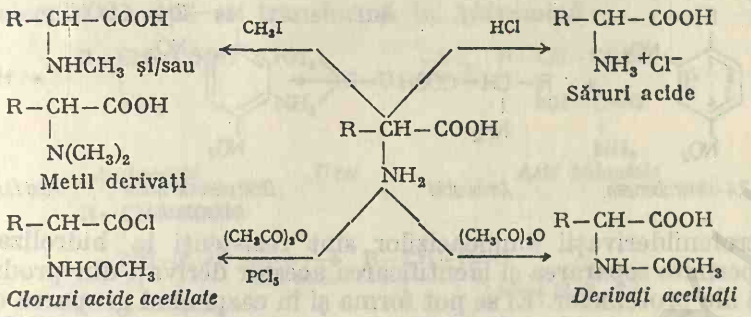
Ninhidrină *Aminoacid* *Ninhidrină redusă* *Aldehidă*

La valori ale pH-ului mai mari de 5 reacţia aminoacizilor cu ninhidrina decurge cu formarea de bioxid de carbon, aldehidă şi a unui compus colorat în albastru :

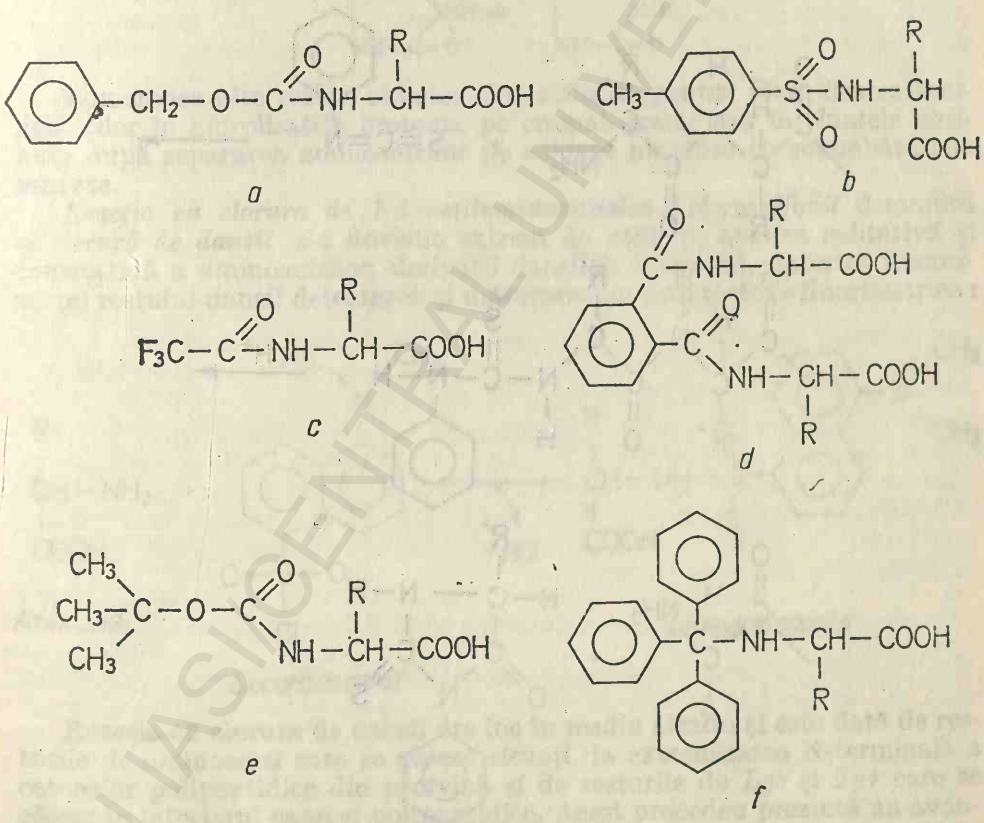


Reacţia cu ninhidrina este frecvent utilizată în laboratoarele de biochimie atît pentru identificarea aminoacizilor pe cromatograme, cît şi pentru determinarea cantitativă a aminoacizilor după intensitatea culorii, sau după volumul de bioxid de carbon degajat.

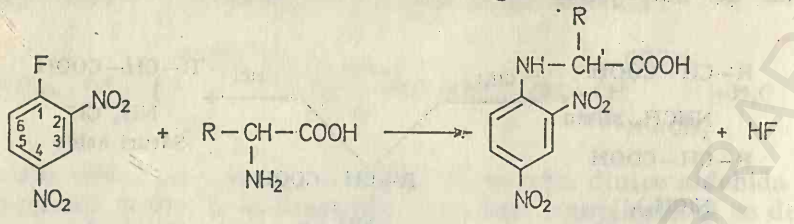
Alte reacţii ale grupării amino a aminoacizilor sînt redate sumar în schema de mai jos :



În sinteza peptidelor sînt utilizaţi aminoacizii în care gruparea amino este protejată printr-o grupare de protecţie care poate forma derivaţi de tipul (a) carbobenzoici—, (b) tozil—, (c) trifluoroacetil — (d) ftaloid—, (e) t-butiloxicarbonil-, (f)tritil-aminoacid :



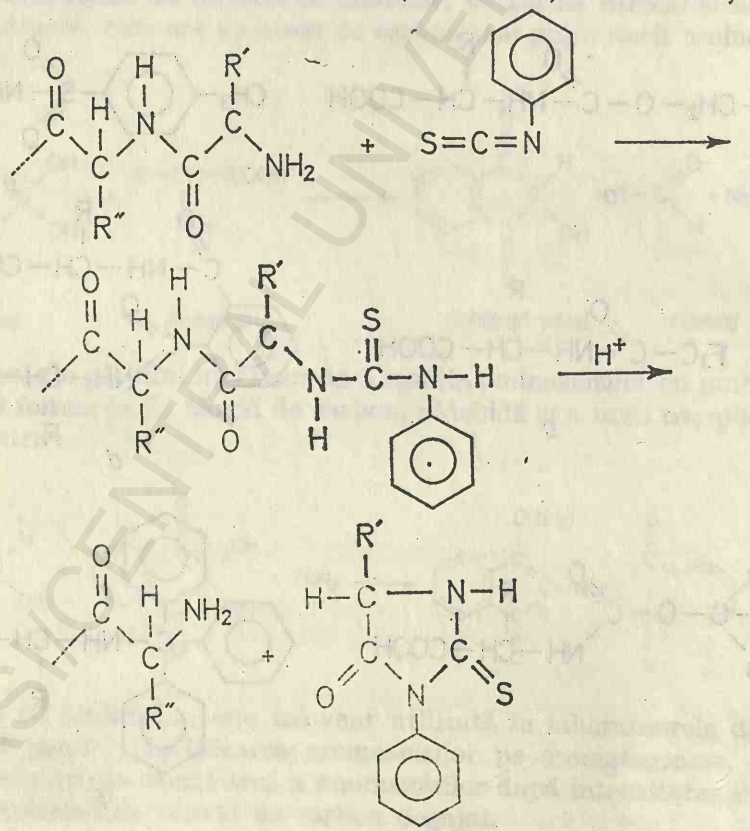
Formarea dinitroderivaților. Cu *1-fluor-2, 4-dinitrobenzenul* aminoacizii formează dinitrofenil derivați, de culoare galbenă:



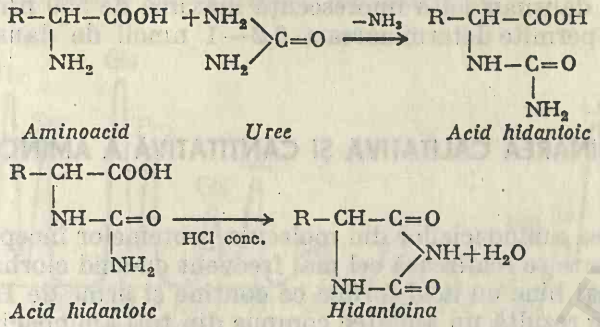
1-Fluor-2,4-dinitrobenzen — *Aminoacid* — *Dinitrofenilderivatul aminoacidului* — *Acid fluorhidric*

Dinitrofenilderivații aminoacizilor sînt rezistenți la hidroliza acidă, ceea ce permite separarea și identificarea acestor derivați din produsele de hidroliză ale proteinelor. Ei se pot forma și în cazul cînd gruparea carboxil a aminoacidului este blocată. Datorită acestei reacții a fost posibilă determinarea aminoacizilor din poziția N-terminală a moleculelor de proteine.

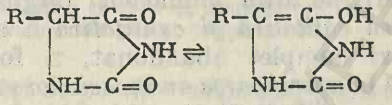
Reacția cu feniltioizocianat. Aminoacizii din poziția N-terminală a moleculelor de peptide, rezultate după hidroliza proteinelor, pot reacționa cu *feniltioizocianatul* cu formare *de feniltiocarbonați*, aceștia în mediu acid se transformă în *feniltiohidantoine* ale aminoacizilor N-terminali, compuși care pot fi separați în mediu anhidru (nitrometan, HCl 3*n* etc.):



Aminoacizii sînt capabili să formeze hidantoine şi sub *acţiunea ureii*, cînd după pierderea de amoniac are loc cuplarea ureii cu formare de *acid hidantoic*. Acidul hidantoic în mediu de HCl concentrat şi prin pierderea unei molecule de apă se transformă în *hidantoină*:

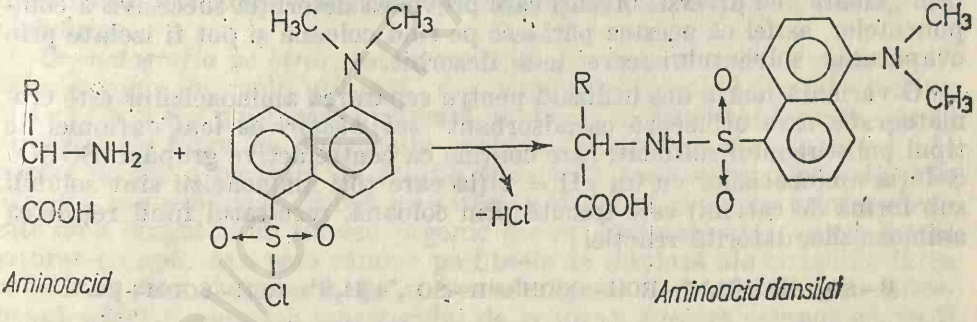


Hidantoinele, ca dealtfel şi feniltiohidantoinele, sînt folosite pentru identificarea cromatografică a aminoacizilor. În *prezenţa soluţiilor alcaline hidantoinele* pot însă suferi un proces de enolizare:



Numeroase alte reacţii chimice sînt utilizate pentru identificarea aminoacizilor în hidrolizatele proteice, pe cromatograme sau în eluatele obţinute după separarea aminoacizilor pe coloane umplute cu schimbători de ioni etc.

Reacţia cu clorura de 1-dimetilaminonaftalen-5-clorosulfonil denumită şi *clorură de dansil* s-a dovedit extrem de utilă în analiza calitativă şi cantitativă a aminoacizilor, derivaţii dansilaţi înlesnind, datorită fluorescenţei restului dansil detectarea şi măsurarea lor prin metode fluorimetrice:



Reacţia cu clorura de dansil are loc în mediu alcalin şi este dată de resturile de aminoacizi care se găsesc situaţi la extremitatea N-terminală a catenelor polipeptidice din proteină şi de resturile de *Lys* şi *Tyr* care se găsesc în interiorul catenei polipeptidice. Acest procedeu prezintă un avan-

taj incontestabil față de metoda cu dinitrofluorbenzen, deoarece permite identificarea aminoacizilor dansilați imediat după hidroliza acidă a acestora, fie pe cale electroforetică, fie prin cromatografie, fără să mai fie necesară extracția lor din hidrolizatul proteinei.

Aminoacizii dansilați au o fluorescență maximă de 550 nm și sensibilitatea metodei permite determinarea a 0,2—1 nmoli de dansilaminoacid.

1.5. DETERMINAREA CALITATIVĂ ȘI CANTITATIVĂ A AMINOACIZILOR

Determinarea aminoacizilor din molecula proteinelor începe prin hidroliza acestora, care se realizează cel mai frecvent cu acid clorhidric 6N prin fierbere, sau mai bine cu acid formic ce conține și urme de HCl. În urma acestei hidrolize rezultă un amestec compus din toți aminoacizii care alcătuiau molecula proteinei mai puțin triptofanul, care în cursul hidrolizei este descompus. Hidroliza decurge mai rapid în mediu bazic (de exemplu de hidroxid de bariu), cînd triptofanul este menajat, în schimb au loc racemizări și descompuneri ale altor aminoacizi (arginina, cistina, cisteina).

Pentru determinarea calitativă și cantitativă a aminoacizilor, cel mai vechi procedeu, astăzi complet abandonat, a fost cel preconizat de E. Fischer și constă în *esterificarea aminoacizilor și distilarea fracționată a esterilor* (aminoacizii nu pot fi distilați nici în vid, deoarece se descompun).

Cromatografia cu diversele ei variante ocupă astăzi un loc deosebit de însemnat în tehnica separării identificării și determinării aminoacizilor.

În principiu, metoda cromatografică utilizează coloane umplute cu material absorbant (cărbune activ, oxid de aluminiu) peste care soluția amestecului componenților este lăsată să treacă în ritm lent. Componenții sînt adsorbiți la diverse nivele de-a lungul coloanei, nivele ce pot fi distanțate prin așa-numita „developare" a cromatogramei cu ajutorul unor solvenți lăsați să străbată coloana. Separarea componenților este continuată prin „eluare" cu diverși solvenți care provoacă desorbția succesivă a componentelor, astfel că acestea părăsesc pe rînd coloana și pot fi izolate prin evaporarea solventului care le-a desorbit.

O variantă foarte des utilizată pentru separarea aminoacizilor este cromatografia care utilizează ca adsorbant *schimbători de ioni* cationici de tipul polistirenului sulfonat, care conține ca centre active grupări $-SO_3Na$. Soluția aminoacizilor cu un $pH = 2$ (la care toți aminoacizii sînt solubili sub formă de cationi) este trecută prin coloană, rezultatul fiind reținerea aminoacizilor datorită reacției:

$$R-SO_3-Na + [H_3N^+-RCH-COOH \rightarrow R-SO^-_3 + [H_3N^+-RCH-COOH + [Na^+$$

Urmează eluarea coloanei cu soluții tampon de pH din ce în ce mai alcaline, care are ca rezultat eliberarea succesivă a aminoacizilor în funcție de pH izoelectric la care forma dipolară a ionilor formați slăbește legătura cu gruparea schimbătorului de ioni:

$$R-SO_3^- + H_3N^+-CHR-COOH \xrightarrow{Na^+ + OH^-} R-SO_3^-Na^+ + \overset{+}{H_3}N-CHR-COO^- + H_2O$$

Metoda are avantajul că este practic cantitativă, necesită cantităţi mici de substanţă (3—6 mg proteină) şi se pretează la folosirea unor instalaţii sau aparate de analiză automatizate. Rezultatul analizei este reprezentat sub forma unei diagrame (fig. 1.5), în care pe abscisă apar cantităţile de eluent, iar pe ordonată concentraţia aminoacizilor.

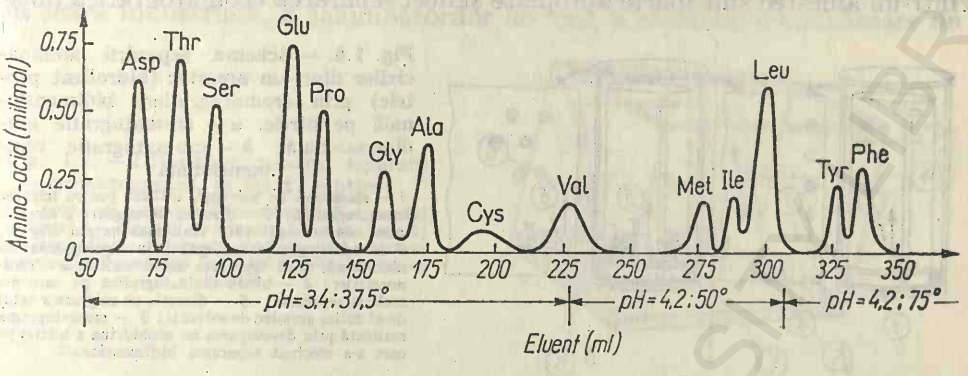


Fig. 1.5 — Cromatograma eluatelor obţinute prin separarea, cu ajutorul unui analizor automat a unui hidrolizat proteic, utilizînd o coloană de schimbător ionic (tip polistirenic), la diferite valori ale *p*H şi temperaturii.

Metoda cromatografiei de partiţie utilizează pentru umplerea coloanelor materiale inerte (SiO_2 precipitat, pămînt de diatomee sau amidon) şi se bazează pe fenomenul de repartiţie selectivă a componenţilor de separat între două faze lichide nemiscibile sau parţial miscibile. Substanţa din coloană serveşte doar ca suport pentru aşa-numita *fază staţionară*, în cazul de faţă soluţia apoasă a aminoacizilor. Coloana este apoi eluată cu un solvent nemiscibil sau parţial miscibil cu apa, care reprezintă *faza mobilă*. Aminoacizii solviţi în apă sînt extraşi cu viteze diferite de solventul ce reprezintă faza mobilă şi sînt astfel separaţi unii de alţii, repartizîndu-se în diversele fracţiuni care se colectează separat şi în care ulterior se determină cantitativ aminoacidul cu ajutorul reacţiei de culoare a acestuia cu ninhidrina.

Cromatografia pe hîrtie, este o variantă a acestei metode, simplă şi eficace, extrem de mult utilizată, dezvoltată de Consden, Gordon, Martin şi Synge, care utilizează ca suport al fazei staţionare o bandă de hîrtie de filtru de dimensiuni corespunzătoare, pe care se depune în partea de jos o picătură de soluţie apoasă de aminoacizi (sînt suficiente 0,2—0,4 mg proteină). Hîrtia este irigată lăsînd să se ridice prin capilaritate de-a lungul ei un solvent organic (de ex. butanol : acid acetic fenol) saturat cu apă. Apa care rămîne pe fibrele de celuloză ale hîrtiei de filtru constituie faza staţionară, iar solventul organic faza mobilă care antrenează selectiv compuşii amestecului de analizat. Fiecare component va fi antrenat la o anumită distanţă faţă de linia de start şi cu viteză diferită în funcţie de coeficientul de repartiţie între cele două faze lichide. Cînd frontul solventului s-a ridicat pînă aproape de partea superioară a hîrtiei, cromatografia se întrerupe, hîrtia se usucă şi se pulverizează cu ninhidrină, observîndu-se apariţia unor pete albastre corespunzînd diverşilor aminoacizi din amestecul de analizat. Identificarea aminoacizilor se face prin

determinarea valorii R_f *(factor de retenție)* care reprezintă raportul dintre distanța parcursă de o componentă a amestecului și distanța parcursă de frontul solventului și care constituie o caracteristică a unui aminoacid pentru un amestec de solvenți dat.

În cazul în care valorile R_f pentru mai mulți aminoacizi conținuți într-un amestec sînt foarte apropiate și deci separarea cromatografică obiș-

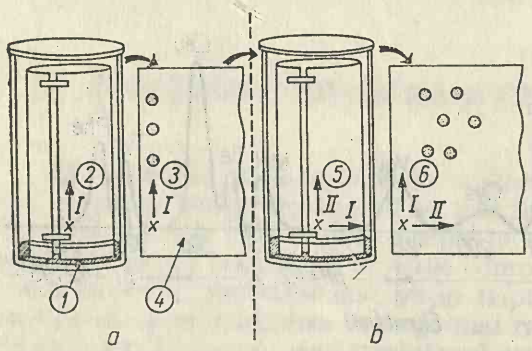


Fig. 1.6. — Schema separării aminoacizilor dintr-un amestec (hidrolizat proteic) prin cromatografiere bidimensională pe hîrtie. a — cromatografie unidimensională; b — cromatografie bidimensională:

1 — amestecul de solvenți, utilizat pentru irigarea cromatografică; *2* — direcția de migrare a amestecului de solvenți care realizează prima irigare; *3* — cromatograma realizată prin developarea cu ninhidrină, după separarea unidimensională a aminoacizilor; *4* — hîrtia cromatografică pe care s-a realizat separarea; *5* — direcția de migrare a celui de-al doilea amestec de solvenți; *6* — cromatograma realizată prin developarea cu ninhidrina a hîrtiei pe care s-a efectuat separarea bidimensională.

nuită este dificilă sau chiar imposibilă, se folosește *cromatografia bidimensională*, care constă în efectuarea unei duble cromatografii monodimensionale pe direcții perpendiculare și utilizîndu-se două amestecuri diferite de solvenți. Avantajul metodei este evident dacă se compară cele două cromatograme din figura 1.6. Cromatograma *a* reprezintă situația după prima irigare, iar cromatograma *b* situația după aplicarea celei de a doua cromatografii pe direcție perpendiculară. Cele trei spoturi inițiale în care cei șase aminoacizi nu au putut fi izolați s-au separat în șase spoturi perfect distincte corespunzătoare celor 6 aminoacizi din amestec.

Determinarea cantitativă a aminoacizilor separați pe cale cromatografică se poate realiza măsurînd spectrofotometric intensitatea coloratiei petelor lăsate de aminoacizi pe cromatogramă. O altă posibilitate de determinare a aminoacizilor separați cu ajutorul cromatografiei este cea care utilizează *spectrofotometria în infraroșu*, fiecare aminoacid avînd un spectru caracteristic în *IR*.

Perfecționările neîncetate în metodologia separării aminoacizilor au dus la construirea de aparate automate, bazate pe separarea cromatografică și dozarea spectrofotometrică a acestora, aparate în care rezultatele sînt înregistrate grafic cu o precizie de 1—2%.

Metodele cromatografice sînt uzual clasificate după natura forțelor care influențează separarea și conform izotermelor de distribuție. Echilibrul care se stabilește prin trecerea unei faze mobile printr-o fază staționară se datorește următoarelor perechi de faze: lichid-lichid; lichid-gel; lichid-suprafața fazei solide; gaz-lichid; gaz-suprafața fazei solide. Cînd în separarea cromatografică este implicat echilibrul între două lichide sau între un lichid și un gaz procesul se numește *cromatografie de partiție*, iar cînd echilibrul se stabilește între un lichid și suprafața unei faze solide — *cromatografie de adsorbție*. Dacă componentele sînt legate chimic fie la suprafața fazei staționare, fie în interiorul fazei staționare procesul se numește *cromatografie chimică*, de exemplu, cromatografia pe schimbători de

ioni. În analiza şi separarea aminoacizilor şi a proteinelor se folosesc şi *cromatografia de precipitare, cromatografia prin cernere moleculară, cromatografia bazată pe chemiosorbţie ireversibilă, cromatografia gazoasă, cromatografia în strat subţire ş.a.* (fig. 1.7). Se poate afirma că biochimia a creat o industrie aparte pentru prepararea pe cale biochimică sau chimică, la scară industrială, a schimbătorilor de ioni, a răşinilor schimbătoare de

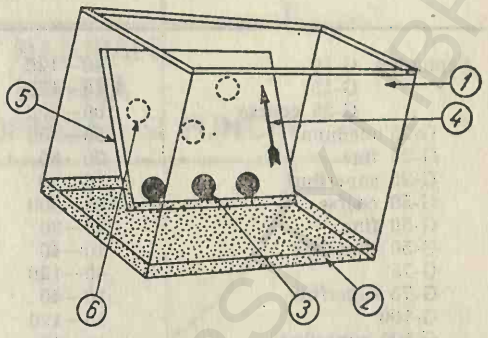


Fig. 1.7. — Dispozitiv pentru separare cromatografică în strat subţire:
1 — tancul; 2 — amestecul de solvenţi; 3 — punctul de strat; 4 — direcţia de migrare; 5 — placa suport; 6 — spoturile de aminoacizi obţinute după migrarea amestecului de solvenţi 2 şi după developarea lor cu ninhidrină.

electroni, a răşinilor comerciale, a schimbătorilor de ioni pe bază de celuloză (AE-celuloză, DEAE-celuloză, TEAE-celuloză, GE-celuloză, PAB-celuloză, ECTEOLA-celuloză etc.) * cu particule de mărimi diferite şi destinaţi celor mai diverse scopuri analitice biochimice.

O largă utilizare în biochimia analitică cunosc gelurile de Sephadex, preparate din polizaharidul microbian-*dextran* (v. cap. 9) prin legare încrucişată cu *epiclorhidrina.* Reţeaua produsului format poate fi strînsă sau laxă, după numărul legăturilor încrucişate care se formează în moleculă: un număr mare de legături încrucişate duce la formarea unor particule cu porozităţi scăzute, iar un număr mic de legături încrucişate conduce la o structură poroasă. Pentru acelaşi grad de porozitate se pot prepara particule de dimensiuni mici (tipul „fine"), medii (tipul „medium") sau mari (tipul „coarse"). Particulele fine sînt utilizate pentru separarea mai eficientă a substanţelor dintr-un amestec, dar eluţia coloanei este de durată deoarece viteza de eluţie este adesea foarte mică; particulele mari conduc la o separare rapidă a unui amestec dar puterea de rezoluţie este mai mică.

Preparatele de Sephadex au unele *proprietăţi fizice* (capacitate de umflare, gradul de porozitate ş.a.), *chimice* (insolubili în apă şi solvenţi organici, în soluţii tampon slab acide şi alcaline etc.), *cromatografice* (limita de exclusiune, volumul stratului total de gel ş.a.m.d.) *care impun selecţionarea lor în funcţie de scopul analitic* urmărit şi de *natura chimică a componentelor* care urmează să fie analizate sau separate. În tabelul 1.5 sînt redate unele caracteristici ale tipurilor de Sephadex folosite curent în biochimia analitică.

* AE-aminoetil-; DEAE-dietilaminoetil-; TEAE-trietilaminoetil-; GE-guanidinoetil-; PAB-*p*-aminobenzil; ECTEOLA-trietanolamină cuplată cu celuloză prin intermediul unor punţi gliceril şi poligliceril.

TABELUL 1.5

Cîteva caracteristici ale tipurilor de Sephadex utilizate curent în laboratoarele de biochimie

Tipul de Sephadex *	Dimensiunile particulelor (m/u)	Gradul de îmbibare a gelului (ml de apă/g de gel)	Domeniul de reţinere a proteinelor după masa lor moleculară
Sephadex G-10	40—120	1,0±0,1	⟶ 700
G-15	40—120	1,5±0,2	⟶ 1 500
G-25 coarse	100—300	2,5±0,2	1 000— 5 000
G-25 medium	50—150	2,5±0,2	1 000— 5 000
G-25 fine	20—80	2,5±0,2	1 000— 5 000
G-25 superfine	10—40	2,5±0,2	1 000— 5 000
G-50 coarse	100—300	5,0±0,3	1 500— 30 000
G-50 fine	20—80	5,0±0,3	1 500— 30 000
G-50 superfine	10—40	5,0±0,3	1 500— 30 000
G-75	40—120	7,5±0,5	3 000— 70 000
G-75 superfine	10—40	7,5±0,5	3 000— 70 000
G-100	40—120	10,0±1,0	4 000—150 000
G-100 superfine	10—40	10,0±1,0	4 000—150 000
G-150	40—120	15,0±1,5	5 000—400 000
G-150 superfine	10—40	15,0±1,5	5 000—400 000
G-200	40—120	20,0±2,0	5 000—800 000
G-200 superfine	10—40	20,0±2,0	5 000—800 000

* Denumirile diferitelor tipuri de Sephadex sînt date după terminologia originală a firmei producătoare Pharmacia Uppsala.

Gelurile de Sephadex sînt utilizate în scopuri *analitice* (analiza probelor multicomponente, determinarea masei moleculare, a constantelor de echilibru cromatografia de partiţie cu solvenţi organici, precipitarea zonală, electroforeza zonală, gelfiltrarea în strat subţire ş.a.), *preparative* (desalifierea preparativă, desalifierea industrială, concentrarea soluţiilor diluate) şi *industriale* (separarea de antibiotice, purificarea de proteine-hormoni, de anticorpi, de enzime folosite în industrie sau în medicină) *de obţinere a unor preparate pure*, omogene de peptide şi polipeptide biologic active etc.*

* Tehnica folosirii preparatelor de Sephadex în scopuri analitice şi industriale face astăzi obiectul unor lucrări monografice în care sînt tratate toate aspectele teoretice şi practice ale acestei probleme.

BCUMSVICENTRU

2

PEPTIDE NATURALE ȘI DE SINTEZĂ STRUCTURĂ, PROPRIETĂȚI ȘI FUNCȚII

Studiul *peptidelor naturale* și de sinteză este strîns legat de cercetările privind compoziția chimică a moleculelor proteice și natura chimică a legăturilor dintre resturile de aminoacizi întîlnite în proteine. Dacă în etapele inițiale, în primele decenii ale secolului nostru, au fost cercetate cu asiduitate natura și proprietățile produselor de hidroliză chimică a moleculelor proteice, în ultimele decenii de o atenție deosebită s-au bucurat studiile privind proprietățile peptidelor de sinteză și ale peptidelor naturale.

Peptidele naturale sînt sintetizate de microorganisme, plante și animale și ele îndeplinesc în celulele și organismele vii cele mai diferite roluri : *componente structurale ale țesuturilor, transportori de electroni, factori de eliberare ai hormonilor, hormoni, antibiotice, toxine, inhibitori naturali ai enzimelor* ș.a.

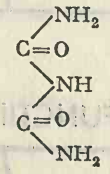
Biochimia peptidelor de sinteză s-a dezvoltat în strînsă legătură cu studiile privind raportul dintre structura polipeptidelor și proprietățile lor biologice. Ea cunoaște în prezent o perioadă de înflorire ca urmare a numeroaselor aplicații practice ale analogilor sintetici structurali ai peptidelor și polipeptidelor.

Începînd din anul 1953 cînd D u V i g n e a u d și c o l a b o r a t o r i i au reușit să sintetizeze în laborator *ocitocina* și *vasopresina*, care conțin cîte nouă resturi de aminoacizi, s-au realizat numeroase sinteze în laborator de peptide naturale active biologic, de exemplu, hormonul α-melanocitostimulator (24 resturi de aminoacizi), hormonul adrenocorticotrop (39 resturi), bradikinina (9 resturi) etc. care au culminat cu sinteza insulinei (51 de resturi de aminoacizi).

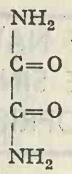
După numărul resturilor de aminoacizi care se întîlnesc în molecula peptidelor se deosebesc *di-*, *tri-*, *tetra-*, *penta-* etc. și *polipeptide*. În general, peptidele care conțin un număr limitat de resturi de aminoacizi, de obicei

mic şi cunoscut, alcătuiesc grupa *oligopeptidelor*, iar cele cu un număr mare de resturi de aminoacizi — grupa *polipeptidelor*.

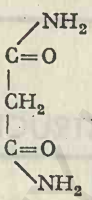
Toate peptidele care conţin cel puţin trei aminoacizi, în mediu alcalin şi în prezenţa sulfatului de cupru, dau o coloraţie violetă sau roşu-violetă. Această reacţie este pozitivă şi pentru compusul denumit *biuret*, din care cauză a fost denumită *reacţia biuretului* şi este specifică şi pentru amida acidului oxalic şi a acidului malonic:



Biuret



Amida acidului oxalic

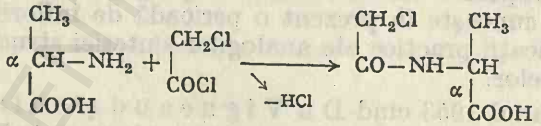


Amida acidului malonic

Compuşii organici care nu au gruparea —CO—NH—, denumită şi *legătură peptidică*, nu dau reacţia biuretului. Din formulele compuşilor menţionaţi mai sus reiese că pentru obţinerea unei reacţii pozitive a biuretului este necesară prezenţa a cel puţin două legături peptidice. Dacă, de exemplu, molecula peptidei sau moleculele proteinelor sînt hidrolizate într-un mediu puternic acid reacţia biuretului pentru hidrolizatul rezultat va fi negativă. Pe baza acestor observaţii s-a emis ipoteza că reacţia biuretului este condiţionată de particularităţile legăturilor dintre resturile aminoacizilor prezenţi în molecula proteinelor.

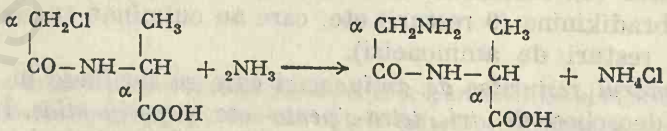
2.1. SINTEZA PEPTIDELOR

Confirmarea existenţei legăturii peptidice în structura proteinelor a fost făcută la începutul secolului al XX-lea cînd Emil Fischer (1903) a reuşit să sintetizeze în laborator polipeptide. În acest scop, Fischer şi Abderhalden au folosit un aminoacid, de exemplu alanina şi o clorură acidă, de exemplu clorura acidului acetic:



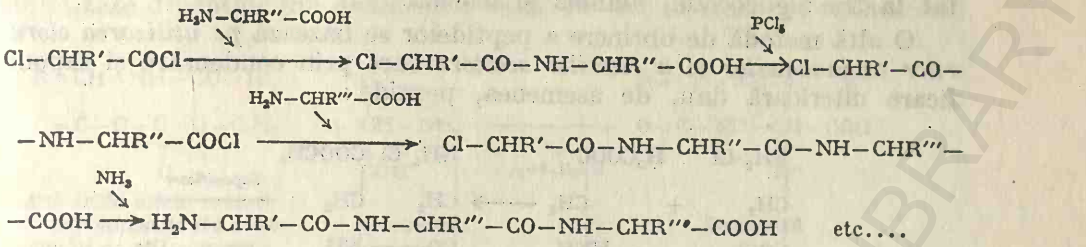
Alanină — *Clorura acidului monoclor acetic* — *Cloracetilalanina*

Produsul rezultat tratat cu amoniac dă naştere unei *dipeptide* —glicil-alanina:



Cloracetilalanina — *Glicil-alanina* — *Clorura de amoniu*

Metoda se pretează la sinteza unor peptide superioare:

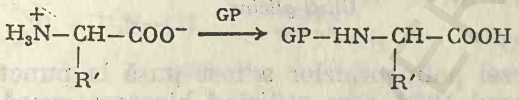


Această metodă i-a permis lui E. Fischer și colaboratorilor săi să sintetizeze o octadecapeptidă (leucil-triglicil-leucil-triglicil-leucil-octaglicil-glicina).

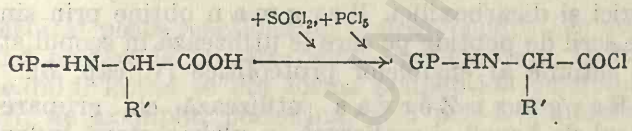
În principiu problema sintezei polipeptidelor constă în *protejarea grupării amino a aminoacidului* ce urmează a fi condensată cu un rest al altui aminoacid. Protejarea este necesară pentru a se evita reacția secundară de condensare a două molecule ale aceluiași aminoacid.

Etapele sintezei sînt următoarele:

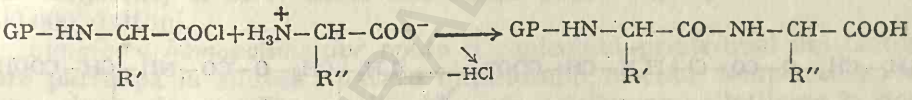
1) *Blocarea grupării amino cu ajutorul unei grupări de protecție* (GP):



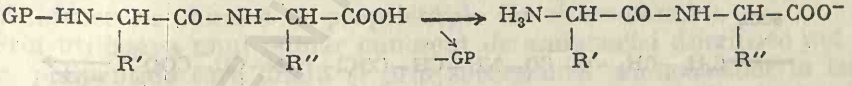
2) *Activarea aminoacidului*:



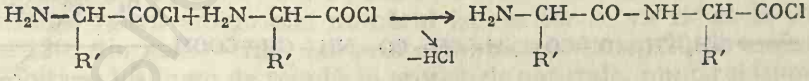
3) *Formarea legăturii peptidice*:



4) *Îndepărtarea grupării protectoare*:



Prin protejarea grupării $-NH_2$ a aminoacidului $^{+}H_3N-CHR-COO^{-}$ a fost evitată reacția secundară:

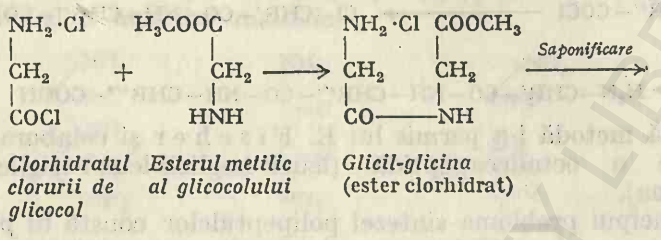


O altă problemă importantă ce se ivește în cazul acestei sinteze este alegerea grupării protectoare în așa fel încît odată cu hidroliza acesteia din molecula peptidei să nu poată avea loc și hidroliza grupării peptidice.

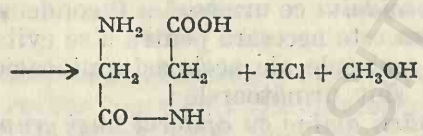
Folosind această metodă Emil Fischer și ulterior Abderhalden au reușit să sintetizeze polipeptide care conțineau resturile a 18 și 19

aminoacizi, dar numărul aminoacizilor utilizaţi în aceste sinteze era limitat la trei: glicocolul, alanina şi leucina.

O altă metodă de obţinere a peptidelor se bazează *pe utilizarea clorurilor aminoacizilor şi a esterilor acestora* care prin condensare şi saponificare ulterioară dau, de asemenea, peptide:



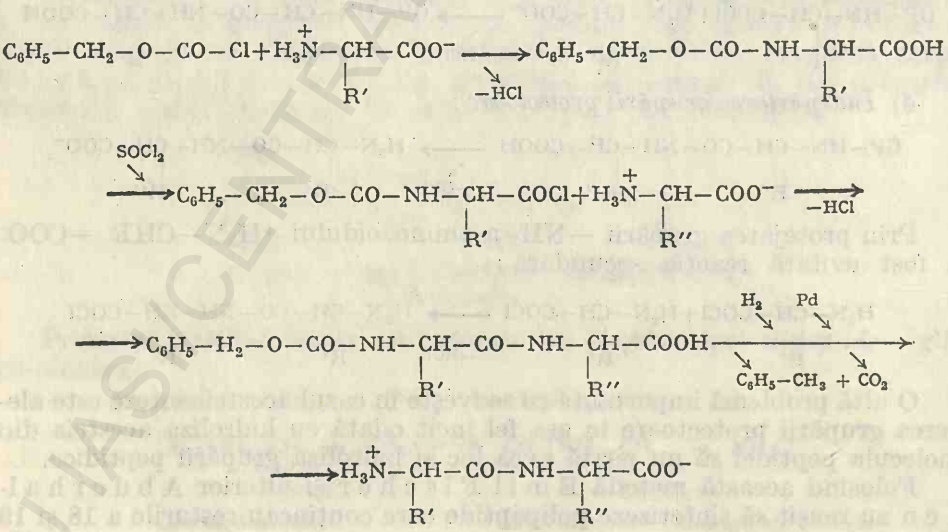
Clorhidratul clorurii de glicocol — *Esterul metilic al glicocolului* — *Glicil-glicina* (ester clorhidrat)



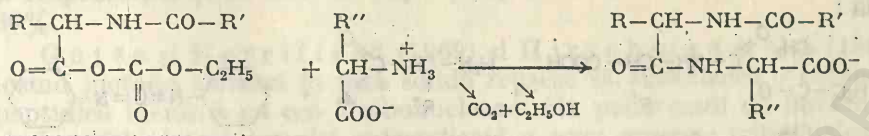
Glicil-glicina

Tehnica sintezei polipeptidelor a fost pusă la punct de Bergman şi Zervas în anul 1932, care utilizînd blocarea grupării amino cu ajutorul clorocarbonatului de benzil au sintetizat peptide care conţineau aminoacizi bibazici şi dicarboxilici. Bergman obţine prin sinteză în laborator diferite serii de peptide pe care le utilizează în scopul studierii mecanismului de acţiune al enzimelor proteolitice (v. cap. 6).

Metoda Bergman-Zervas utilizează ca grupare protectoare clorocarbonatul de benzil şi realizează în ultima etapă îndepărtarea acestuia prin hidrogenare catalitică (aceasta nu afectează legătura peptidică):

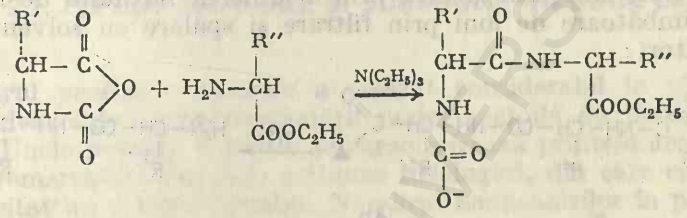


În 1951 V a u g h a n reușește să pună la punct o nouă metodă și să sintetizeze dipeptide din *anhidridele mixte ale aminoacizilor și aminoacizi*:



Anhidrida mixtă a unui N-acilaminoacid și a carbonatului de etil clorurat — *Aminoacid* — *Dipeptidă*

Peptidele se pot obține și plecînd de la *carboxianhidridele aminoacizilor, care în mediu anhidru și în prezența bazelor terțiare*, de exemplu, a trietilaminei se pot condensa cu esterii aminoacizilor cu formare de săruri de trietilamoniu ale esterilor N-carboxipeptidelor. Sărurile N-carboxipeptidelor sînt instabile la temperatura de 30—40°C și se descompun cu formare de bioxid de carbon, bază terțiară și dipeptidă esterificată.



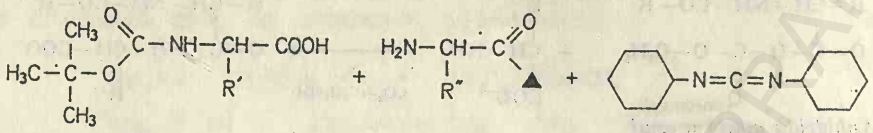
Esterul rezultat poate reacționa, în aceleași condiții, cu noi molecule de anhidridă dînd naștere la tri-tetra-penta- poli-peptide. În funcție de natura aminoacidului inițial se pot forma polipeptide macromoleculare sau *poliaminoacizi*, de exemplu, poliserina, acid poli-*D*-glutamic, acidul poliaspartic, polialanină etc., adică așa-zisele homopolipeptide sau *polipeptide monotone*, a căror masă moleculară poate depăși, în unele cazuri, 300 000 daltoni.

Lungimea homopolimerilor poate fi controlată printr-unul din factorii care participă la sinteză: natura inițiatorului reacției, temperatura, natura solventului etc. Homopolimerii aminoacizilor nu se întîlnesc în stare naturală, iar în laborator servesc ca modele pentru studiul raporturilor dintre structura chimică și proprietățile lor fizico-chimice.

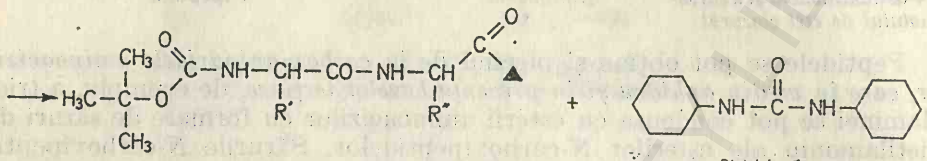
Prin utilizarea unui număr cunoscut de aminoacizi diferiți se pot sintetiza polipeptide care diferă și prin succesiunea aminoacizilor în lanțul polipeptidic, se pot obține diferiți izomeri. Fie, de exemplu, trei aminoacizi diferiți *a*, *b*, *c*. Prin combinarea lor diferită pot rezulta următoarele 6 tripeptide: *a-b-c*; *a-c-b*; *c-a-b*; *b-a-c*; *c-b-a*; *b-c-a*. Dacă pentru sinteză se vor folosi patru aminoacizi numărul izomerilor se va ridica la 24, din cinci — 120, din șase — 720, iar prin combinarea dintre 20 de aminoacizi diferiți, cîți se întîlnesc de regulă în proteinele naturale, numărul izomerilor posibili va fi de 2 432 902 008 176 640 000.

În anul 1965 M e r r i f i e l d și a l ț i i imaginează o nouă metodă de sinteză a polipeptidelor denumită *sinteză în fază solidă*. Pentru sinteza unei dipeptide se folosește *un aminoacid a cărui grupare amino este blocată și un alt aminoacid care are atașată la extremitatea carboxil o rășină schimbă-*

toare de ioni insolubilă și suficient de mare pentru a fi ușor îndepărtat printr-o simplă filtrare. Aceste două componente ale reacției, în prezența diciclohexilcarbodiimidei, condensează cu formarea unei dipeptide, după reacția :

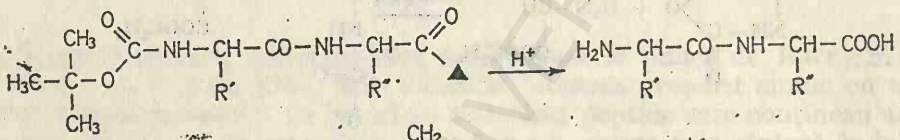


N,N'-Diciclohexilcarbodiimidă



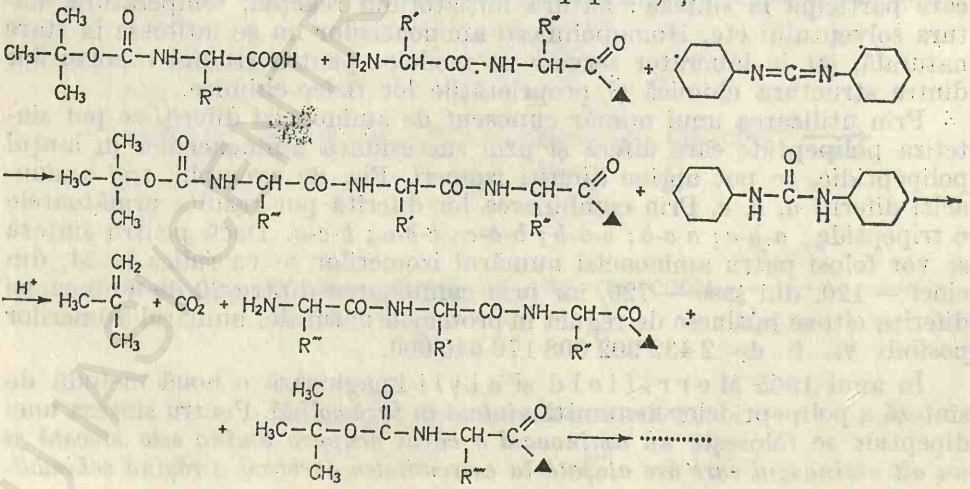
Diciclohexiluree

Dacă se urmărește separarea dipeptidei astfel sintetizată gruparea care blochează NH_2 este îndepărtată prin acidifierea mediului de reacție, iar rășina schimbătoare de ioni prin filtrare și spălare cu solvenți organici corespunzători :



Izobutilenă

Dacă sinteza continuă operațiunea de filtrare și spălare este omisă și dipeptida legată de rășina schimbătoare de ioni, în prezența diciclohexil carbodiimidei și a unui rest de aminoacid cu gruparea amino blocată se condensează din nou cu formarea unei tripeptide, ș.a.m.d :



Metoda și aparatul imaginate de Merrifield și alții au fost utilizate cu deosebit succes pentru sinteza *bradikininei*, a catenelor *A* și *B* ale insulinei și prezintă avantajul că într-un timp relativ scurt, 27 de ore și respectiv, 8 și 11 zile, se obțin polipeptide cu un randament de peste 80%.

Gutte și Merrifield (1969) și Hirschman și alții (1969) folosind metoda sintezei în fază solidă reușesc să sintetizeze o catenă polipeptidică identică cu cea a ribonucleazei din pancreasul de bovine, realizînd astfel *sinteza complet automatizată a unei proteine* (ribonucleaza din pancreasul de bovine are în structura ei 124 de resturi de aminoacizi, v. cap. 6) catalitic active.

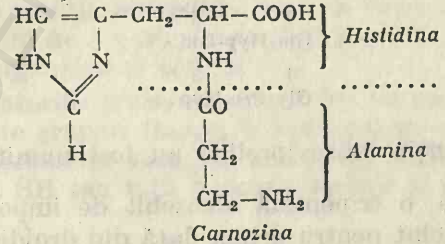
Numeroasele cercetări efectuate în ultimele decenii au confirmat definitiv faptul că legătura de bază dintre resturile de aminoacizi prezenți în peptide și în proteine este legătura peptidică, de natură covalentă.

2.2. PEPTIDE NATURALE ȘI SUBSTANȚE ÎNRUDITE LOR

Numărul *peptidelor naturale* a crescut considerabil în ultimul timp datorită dezvoltării și perfecționării noilor metode de investigație biochimică. Unele peptide naturale se caracterizează printr-o acțiune farmacologică remarcabilă sau prin acțiunea fiziologică, din care cauză studiul lor a suscitat un interes deosebit. Numărul aminoacizilor în peptidele naturale variază de la 2 la *n* aminoacizi. În cele ce urmează se va descrie structura și proprietățile peptidelor naturale care conțin legături peptidice „tipice", adică legături care se formează între gruparea α-amino a unui aminoacid și gruparea carboxil a altui aminoacid, precum și alți compuși naturali în care se întîlnește legătura de tip —CO—NH—.

2.2.1. Dipeptide

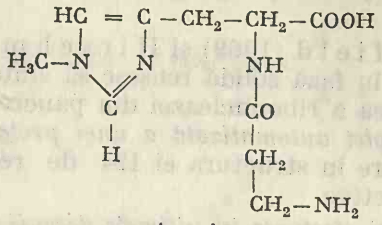
Carnozina a fost izolată din țesutul muscular al mamiferelor de Gulevitsch și Amiraadzibi (1900) și, ulterior, s-a stabilit că ea reprezintă de fapt un dipeptid—β-alanil-L-histidina:



Carnozina

Carnozina este hidrolizată cu formare de β-alanină și histidină, de către enzima *carnozinază*, identificată în ficatul și rinichiul unor animale.

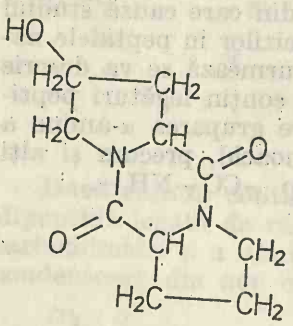
Anserina, derivatul metilat al carnozinei, a fost izolată pentru prima dată din țesutul muscular al păsărilor de către Ackerman (1928), iar ulterior din mușchii mai multor mamifere.



Anserina

Deși ambele dipeptide se găsesc în cantități relativ mari în țesutul muscular și sînt cunoscute în biochimie de mult timp, funcția lor fiziologică este încă insuficient studiată. Este de remarcat faptul că anserina și carnozina sînt dipeptide naturale care conțin un β-aminoacid, și anume, β-alanina. Metilhistidina, parte componentă a anserinei, nu a fost identificată în structura proteinelor, însă a fost izolată din urina mamiferelor.

Prolil-hidroxiprolina. Din urina normală a organismului uman adult a fost separată o dipeptidă prolil-hidroxiprolina care alcătuiește 95 — 97% din totalul hidroxiprolinei eliminate pe cale renală. Această dipeptidă poate exista sub formă de dicetopiperazină.



2.2.2 Tripeptide

Hipropeptide. Din urina normală eliminată de organismul uman adult au fost separate tripeptide care conțin în structura lor prolină și/sau hidroxiprolină și resturi de *Gly* și *Glu*. Următoarele două tripeptide reamintesc prin secvența lor de fragmente din molecula colagenului și formează împreună aproximativ 30 % din hidroxiprolina urinară.

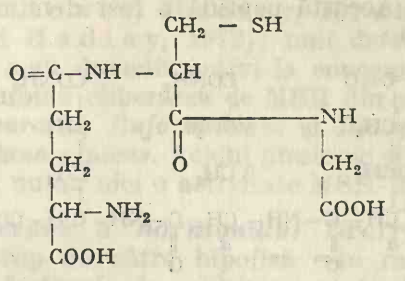
$$\overset{1}{\text{Glu}}\text{-}\overset{3}{\text{Hyp}}\text{-Glu}$$

$$\overset{1}{\text{Gly}}\text{-}\overset{3}{\text{Pro}}\text{-Hyp}$$

Peptidele care conțin hidroxiprolină au fost numite *hipropeptide.*

Glutationul este o tripeptidă deosebit de importantă din punct de vedere biologic. Izolat pentru prima dată din drojdia de bere de către Hopkins în anul 1921, glutationul este un compus universal răspîndit în lumea vie. Structura chimică a glutationului a fost stabilită pe calea

sintezei în laborator și reprezintă un γ-*L-glutamil-L-cisteinil-glicocol*, cu următoarea structură:

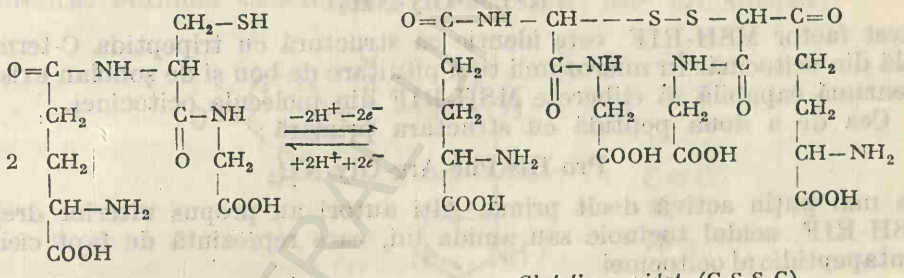


Rest de acid L-glutamic — *Rest de L-cisteină* — *Rest de glicocol*

Glutationul (G-SH)
(γ-*glutamil*-L-*cisteinil*-L-*glicina*

Posedînd două grupări carboxil și o grupare amino libere glutationul se comportă ca și aminoacizii ca un amfolit. Este o substanță incoloră, levogiră și optic activă.

În organism glutationul joacă un rol important, participînd la transferul de electroni și fiind socotit drept un *sistem de oxido-reducere*. Această proprietate importantă a glutationului este condiționată de grupările tiolice libere, care pot fi reduse sau oxidate. În cazul oxidării glutationului, din două molecule de glutation redus se formează o moleculă de glutation oxidat:



Glutation redus (G-SH)
(forma tiolică) tripeptidă

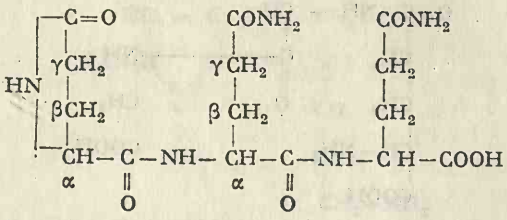
Glutation oxidat (G-S-S-G)
(forma disulfurică) hexapeptidă

Trecerea glutationului de la forma redusă, tiolică, la forma oxidată disulfurică, este o reacție reversibilă care se petrece permanent în celula vie și este catalizată de o enzimă specifică *glutation reductaza*, prezentă în celulele tuturor organelor și țesuturilor.

Glutationul, datorită prezenței grupărilor tiolice în structura sa poate interacționa cu alte grupări tiolice, îndeplinind în unele cazuri și rolul de activator al numeroaselor enzime, îndeosebi, a celor care sînt sensibile față de gruparea SH sau față de unele metale și de unii compuși toxici pentru organism*.

* Sinteza glutationului și participarea lui în organe și țesuturi la diferite sisteme de oxido-reducere este descrisă în cap. 20.

Fastigiatina. Din alga marină *Pelvetia fastigiata* a fost izolată o peptidă care conține acid glutamic și are structura L-pirolidonoil-γ-L-glutaminil-L-glutamina. Această peptidă a fost denumită *fastigiatină* și are următoarea structură:



Melanostatina. MSH este secretat și eliberat de hipofiză sub acțiunea factorilor de reglare ai MSH, *melanoliberina* sau *melanotropin releasing factor* al MSH (MSH-RF) și *melanostatina* sau *melanotropin inhibiting factor* al MSH (MSH-RIF) care au fost izolați din hipotalamusul mamiferelor și amfibienilor.

N a i r și a l ț i i (1971) reușesc să izoleze din extractele hipotalamusului de bou și să purifice de 11 000 ori prin metoda gel-filtrării și cromatografiei în strat subțire doi *hormoni hipotalamici* care inhibă eliberarea hormonului melanocitostimulator. Prin metoda fluorescenței în ultraviolet, analize spectrofotometrice de masă și prin compararea comportării cromatografice cu o peptidă sintetică, aceiași autori ajung la concluzia că „hormonul inhibitor" al MSH, melanostatina sau MSH-RIF este o tripeptidă cu următoarea structură:

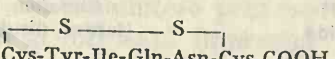
Pro-Leu-Gly-NH_2

Acest factor MSH-RIF este identic ca structură cu tripeptida C-terminală din ocitocină. În microzomii tijei pituitare de bou și de șobolan există o enzimă capabilă să elibereze MSH-RIF din molecula ocitocinei.

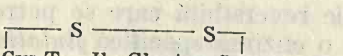
Cea de a doua peptidă cu structura primară:

Pro-His-Phe-Arg-Gly-NH_2

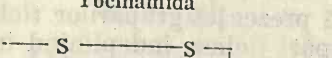
era mai puțin activă decît prima. Alți autori au propus ulterior drept MSH-RIF acidul tocinoic sau amida lui, care reprezintă de fapt ciclul pentapeptidic al ocitocinei



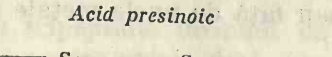
Acid tocinoic



Tocinamidă



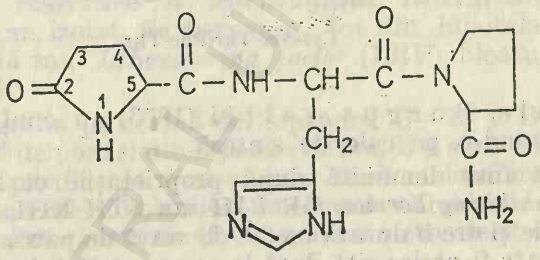
Acid presinoic



Presinamida

deschizînd astfel problema existenței unei *specificități de specie* a acestui hormon hipotalamic (Bower, Hadley, Hruby, 1971; Hruby, Smith, Bower și Hadley, 1972); unii derivați ai acidului tocinoic — tocinamida — s-au dovedit activi la concentrații extrem de mici (10^{-9}— 10^{-12} g/ml) inhibînd eliberarea de MSH din *pars intermedia* de șobolan, *Mesocricetus auratus*, *Bufo marinus* și *Rana catesbiana*, dar fiind inactivi în cazul lui *Rana pipiens*. Acidul presinoic și presinamida, derivați ciclici ai vasopresinei, nu au nici o activitate MSH-R-IF „*in vitro*".

Factorul de eliberare a hormonului tirotrop. Reglarea secreției de hormon tirotrop de către hipofiză este realizată de un factor hipotalamic denumit factorul de eliberare a tirotropului (TRF) sau de eliberare a hormonului tirotrop (TRH; „tirotropin releasing hormon"). Schally, Bowers, Redding și Barrett (1966) au raportat că TRF izolat din hipotalamusul de porc este constituit din trei resturi de aminoacizi care se găsesc în proporții echimoleculare: histidina, prolina și acidul glutamic. Burgus, Dunn, Desiderio și Guillemin (1969), Burgus și alții (1970 *a*, 1971) au arătat că prolina din poziția C-terminală se găsește sub formă aminată, iar restul de acid glutamic din poziția N-terminală sub formă de acid pirolidoncarboxilic, ceea ce explică rezistența acestei tripeptide față de acțiunea enzimelor proteolitice. Tot Burgus și alții (1970 *b*) folosind metode spectrofotometrice de masă, NMR, spectrometria în infraroșu și alte metode specifice pentru chimia peptidelor și proteinelor a demonstrat identitatea de structură a acestui factor cu 2-pirolidon-5-carboxil-histidil-prolin-amida obținută pe cale sintetică. Formula structurală a TRF (TRH) este următoarea:



Hormonul tirotrop-eliberator (TRH) este folosit în clinica medicală cu bune rezultate pentru diagnosticarea timpurie a stărilor de premixoedem în tiroiditele cronice (Takeda, Nakabayashi, Kawato, Ueda, Matsubara, 1975). Utilizarea lui în acest scop se bazează pe axioma că eliberarea de TSH din glanda hipofiză se realizează ca urmare a unei puternice stimulări a mecanismului *feed-back* al axei hipotalamo-hipofizo-tiroidiene.

2.2.3.1. Polipeptide naturale liniare alcătuite din L-aminoacizi

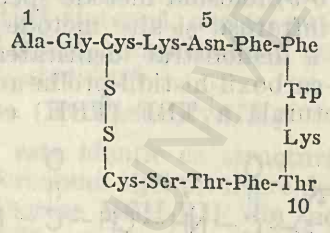
Somatoliberina *(factorul de reglare al hormonului de creștere* SRF sau GH-RF) este o decapeptidă izolată din hipotalamusul animalelor domestice (porc, bou, oaie) și al animalelor de laborator (primate, șobolani albi).

Schally și colab. (1969) au izolat o decapeptidă activă, omogenă și pură a cărei structură primară a fost stabilită ulterior (Schally și alții 1971) și confirmată prin realizarea sintezei ei pe cale de laborator (Veber și alții, 1971). Această decapeptidă s-a dovedit a fi activă atît *in vivo* cît și *in vitro* și are următoarea structură:

Val-His-Leu-Ser-Ala-Glu-Glu-Lys-Glu-Ala
1 5 10

STH-RH (GH-RF) incubat în prezența enzimelor proteolitice — pepsina, papaina, chimotripsina și tripsina — își pierde activitatea biologică, ceea ce demonstrează încă o dată natura lui polipeptidică.

Tot din hipotalamus de oaie a mai fost izolată o peptidă care în cantități infime, de ordinul nanogramelor, este capabilă să inhibe eliberarea hormonului de creștere din adenohipofiză, peptidă denumită *factor inhibitor al hormonului de creștere, (growth inhibitory factor)* precum și *somatostatină* (Brazeau, Burgus, Ling, Butcher, Rivier și Guillemen, 1973). Studiul structurii primare a acestei peptide a arătat că este alcătuită din 14 resturi de aminoacizi și între resturile de cisteină din pozițiile 3 și 14 este prezentă o punte disulfurică:



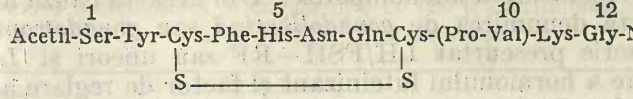
Brazeau, Vale, Burgus și alții (1973) au confirmat structura ei primară, obținînd-o pe cale de sinteză.

Polipeptida a fost denumită după proprietățile ei biologice *growth hormon release inhibiting hormon* GR-RIH sau STH-RIH, nu posedă specificitate de specie și are o durată medie de viață de patru minute. Durata lui de acțiune poate fi prelungită dacă la preparatele injectabile se adaugă gelatină sau zinc-protamină.

Modul în care cei doi factori participă la reglarea concentrației hormonului somatotrop în sînge, la secreția și eliberarea lui din adenohipofiză constituie încă subiectul unor controverse.

Factorul de eliberare a ACTH. Relativ recent s-a stabilit că secreția și eliberarea ACTH sînt guvernate în hipofiză de *factorul de eliberare al ACTH* denumit *corticoliberiană* (*CRF-corticotropin releasing factor*) elaborat în hipotalamus. Stimuli de natură variată — căldură, frig, variații mari de presiune, stări emoționale puternice, frică, foame, reactivi chimici cu acțiune toxică, unele toxine bacteriene, traumatisme, hemoragii, precum și acțiunea unor hormoni ca vasopresina, adrenalina, insulina, tiroxina și alții — declanșează sinteza de CRF acționînd asupra

hipotalamusului. Schally și alții (1958, 1964) reușesc izolarea unui CRF și stabilesc secvența * primară ca fiind:



Această substanță stimulează atît eliberarea de ACTH *in vitro* și *in vivo* însă are și o activitate specifică pentru vasopresină (Mardashev, 1975). Dacă la extremitatea N-terminală a Lys-vasopresinei se cuplează una din peptidele His-Ser sau Ser-His se obțin peptide care posedă o activitate CRF. În prezent se cunosc trei factori de eliberare a ACTH:

— α_1-CRF — o peptidă de dimensiuni relativ mari, apropiat ca structură de α-MSH, care posedă, de asemenea, și activitate biologică specifică pentru ACTH și pentru vasopresină; studiul structurii primare a acestei peptide este în curs de definitivare.

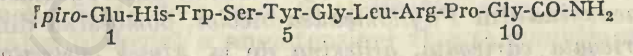
— α_2-CRF — asemănătoare ca structură primară cu α-MSH de care se deosebește însă prin faptul că la extremitatea N-terminală serina nu este acetilată; stimulează eliberarea de ACTH, nu are acțiune vasopresinică, în schimb are o activitate melanoforă ca și preparatele de α-MSH.

— β-CRF — este o peptidă alcătuită din 11 resturi de aminoacizi și are la extremitatea N-terminală un rest de serină acetilată (cum se întîlnește în α-MSH), iar la extremitatea C-terminală un rest de glicină sub formă de amidă (ca în hormonii neurohipofizari — ocitocina și vasopresina). β-CRF are și o însemnată activitate vasopresinică și este mult mai activ decît α_1- și α_2-CRF.

Factorul de eliberare a hormonului luteinizant. Baba și colab. (1971) au izolat, de asemenea, tot din hipotalamus un factor denumit *luliberină* sau *LH-releasing factor* (LRF) alcătuit din opt resturi de aminoacizi.

Prin cromatografia pe coloană de Sephadex G—25 și BioGel P—2, din trei kg de hipofiză de porc și din hipofiza de om, Basova și Ginodman (1968) reușesc să purifice un factor, cu o masă moleculară de 2 500, care administrat parenteral șobolanilor determină eliberarea hormonului luteinizant din hipofiză și este de 40 000 ori mai activ decît extractul tisular crud.

De asemenea, din hipotalamusul de oaie a fost izolat un factor de eliberare al hormonului hipofizar luteinizant, identic ca structură cu factorul similar izolat de la porc și care are următoarea secvență în aminoacizi (Burgus și alții, 1971):



Aceiași autori reușesc să sintetizeze prin metoda în fază solidă o decapeptidă cu aceeași structură primară, confirmînd în felul acesta structura peptidei naturale și demonstrînd că sub acțiunea acestei peptide sintetice

* În biochimie în locul termenului de succesiune se folosește în mod curent termenul de „secvență", acesta pierzîndu-și semnificația obișnuită în limba română de fragment, parte. În tot cuprinsul lucrării va fi utilizat termenul de secvență.

hipofiza eliberează hormon luteinizant și hormon foliculostimulator. Schally și alții (1971) izolează din hipotalamusul de porc o substanță pură cu același efect asupra adenohipofizei. Din această cauză acest factor de reglare poartă denumirea de *gonadoliberină* sau *gonadotropin releasing factor* care se scrie prescurtat LH/FSH—RF sau uneori și LRF—FRF (factor de reglare a hormonului luteinizant și factor de reglare a hormonului foliculostimulator). Demonstrarea existenței LH/FSH—RH se datorește în mare parte experiențelor întreprinse de Schally și colab.

LH/FSH—RH determină pe lîngă eliberarea de LH și FSH și stimularea sintezei de LH și FSH, spermatogeneza, maturarea foliculară, ovulația și ovulația prematură, în funcție de hipotalamusul speciei asupra căreia se experimentează — șobolani, hamster, iepuri, oaie, porc, pisică, pui, maimuță, om (Schally și alții, 1973).

Factorul de inhibiție a prolactinei. Faptul că secreția de prolactină poate fi inhibată de un factor neurohormonal de origine hipotalamică a fost pentru prima dată demonstrat în experiențe *in vitro* efectuate pe șobolani de către Pasteels (1962) și confirmate ulterior de Grosvenor, Mc Cann și Nallar (1965). Acest factor a fost denumit *prolactin release inhibiting hormone* — PRIF sau PIF după nomenclatura IUPAC — IUB și natura lui chimică nu se cunoaște, deși Schally și alții (1973) presupun că este o polipeptidă de mici dimensiuni. În prezent, se cunoaște că secreția și eliberarea de prolactină este controlată de fapt de doi factori hipotalamici — *prolactoliberina* sau *factorul de eliberare al prolactinei* (PRF) și *prolactostatina* sau *factorul de inhibiție al prolactinei* (PIF) a căror structură chimică este necunoscută. Factorul de inhibiție al prolactinei a fost izolat din extractele acetice ale neurohipofizei și eminenței mediane de către Dullar, La Bella, Vivian și Eddie (1974) și s-a dovedit a fi deosebit de piro-Glu-His-Pro-NH_2 și ineficient față de alți hormoni hipofizari (STH, TSH și LH).

Eledoisina și substanțe eledoisin asemănătoare. Din veninul secretat de glandele salivare posterioare ale unor cefalopode (*Eledone moschata, E. aldrovandi*) a fost izolată o polipeptidă cu acțiune vasodilatatoare și stimulatoare a musculaturii netede extravasculare, care în doze mari stimulează și secreția salivară și gastrointestinală. Această polipeptidă a fost denumită *eledoisina*. Peptide cu acțiune vasodilatatoare, hipotensivă, care determină contracția musculaturii netede extravasculare și stimulează glandele salivare și digestive, au fost extrase de Anastasi și alții (1967) Erspamer și alții (1962 — 1972) din glandele cutanate ale amfibienilor : *fiselamina* din *Physalaemus fuscumaculatus*, *filomedusina* din *Phyllomedusa bicolor*, *bombesina* din *Bombina bombina*, *B. variegata variegata*, *alitesina* de la *Alytes obstreticans*, *ranatensina* de la *Rana pipiens*. (Tabelul 2.1). Din hipotalamusul de mamifere (bou) Chang și Leeman (1970) au izolat o undecapeptidă denumită *substanța P*. Cu excepția ultimei, celelalte polipeptide, alcătuite exclusiv din resturi de aminoacizi aparținînd seriei sterice *L*, reamintesc prin structura lor la extremitățile N- și C- terminale de unii factori de eliberare ai hipotalamusului.

TABELUL 2.1

Structura primară a eledoisinei în comparație cu cea a substanțelor eledoisin asemănătoare de diferite proveniențe

Nr. crt.	*Denumirea peptidei*	*Structura primară*
		1 5 10
1.	Eledoisina	piro-Glu-Pro-Ser-Lys-Asp-Ala-Phe-Ile-Gly-Leu-Met-$CONH_2$
		1 5 10
2.	Filomedusina	piro-Glu-Asn-Pro-Asn-Arg-Phe-Ile-Gly-Leu-Met-$CONH_2$
		1 5 10
3.	Bombesina	piro-Glu-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu--Met-$CONH_2$
		1 5 10
4.	Alitesina	piro-Glu-Gly-Arg-Leu-Gly-Thr-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu--Met-$CONH_2$
		1 5 11
5.	Ranatensina	piro-Glu-Val-Pro-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Phe-Met-$CONH_2$
		1 5 10
6.	Substanța *P*	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-$CONH_2$

Angiotensina. Angiotensina I este o substanță de natură polipeptidică care are o acțiune hipertensivă și stimulatorie asupra musculaturii netede. Angiotensina se formează în plasma sanguină. Enzima *renina* localizată în rinichi acționează asupra substratului — fracția α_2-globulinică a proteinelor plasmatice — eliberînd o decapeptidă, denumită *pro-angiotensina* sau *angiotensina I:*

Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu
1 5 10

Decapeptida astfel formată din angiotensinogen are o activitate biologică relativ mică, însă în organism este transformată rapid sub influența reninei în *angiotensina II*, prin hidroliza unei tetrapeptide situată la extremitatea C-terminală. (fig. 2.1).

N g și V a n e (1967, 1968, 1970) și V a n e (1974) au arătat că transformarea angiotensinei I în angiotensină II are loc în cantități mari în plămînii de cobai, șobolani, cîine și de om. În cursul circulației pulmonare, această transformare are loc rapid și se pare că țesutul pulmonar joacă un rol important în metabolismul peptidelor, formarea aminelor și prostaglandinelor. Este posibil ca și alte organe să poată transforma angiotensina I în angiotensină II, într-o cantitate limitată, dar ultima este distrusă înainte de a trece în circulația sanguină.

Activitatea biologică a angiotensinei II este condiționată de prezența nucleului aromatic și a grupării carboxil ale fenilalaninei, a resturilor de prolină, histidină și a grupării hidroxil a tirozinei (B u m p u s și alții, 1970). Celelalte resturi ale aminoacizilor prezenți în structura acestei peptide par a nu avea un rol determinant pentru activitatea ei biologică. J o r g e n s e n și a l ț i i (1970) presupun că restul de prolină joacă un rol deosebit în asigurarea conformației moleculei, iar gruparea guanidil a restului de arginină este esențială pentru activitatea angiotensinei II (tabelul 2.2).

Angiotensina are efecte multiple şi variate asupra metabolismului mitocondrial *in vitro*, asupra fosforilării oxidative, asupra transportului de calciu de către veziculele microsomale, precum şi proprietatea de a forma complecşi cu unii cationi bivalenţi (Co^{2+}, Fe^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}), cu fosfolipidele şi cu unii acizi graşi (Goodfriend, Fyhrquist,

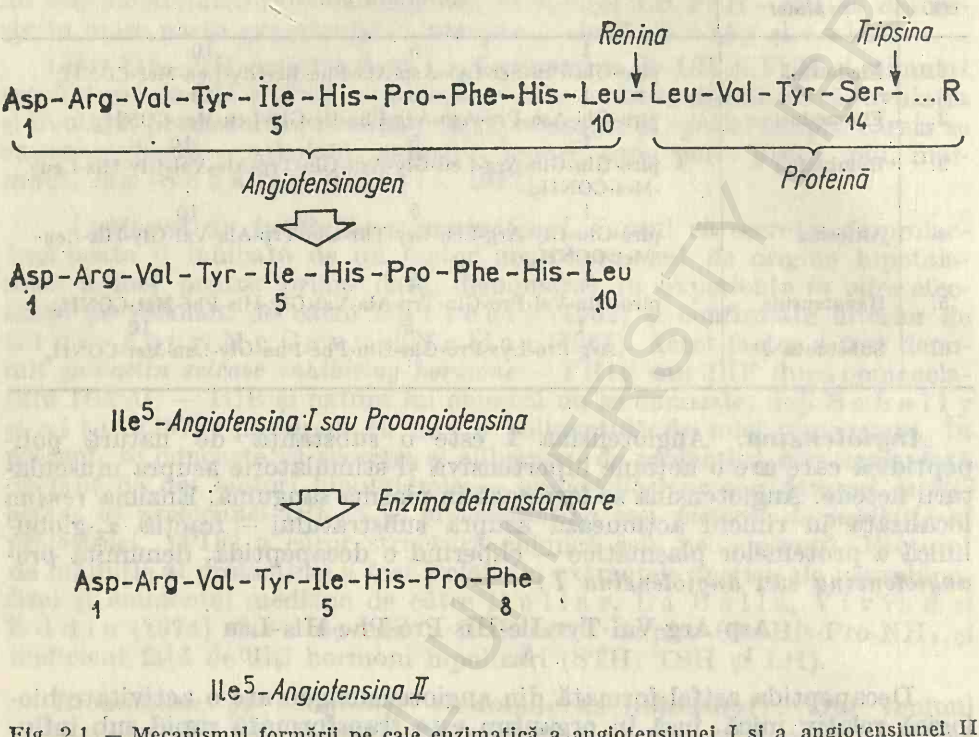


Fig. 2.1. — Mecanismul formării pe cale enzimatică a angiotensiunei I şi a angiotensiunei II din angiotensinogen. Enzima proteolitică rennina are o înaltă specificitate de acţiune, hidrolizînd numai legătura peptidică dintre cele două resturi de *Leu* din poziţiile 10 şi 11 (Schröder şi Lubke, 1966).

TABELUL 2.2

Modificarea resturilor aminoacizilor din poziţiile 1 şi 2 din molecula de angiotensină II şi efectul ei asupra activităţii bilologice

Succesiunea aminoacizilor în peptidă	Activitatea biologică, %
Asp-Arg-Val-TYR-Val-His-Pro-PHE 1 2 3 4 5 6 7 8	100
Gly-Arg-Val-TYR-Val-His-Pro-PHE	50
—— Arg-Val-TYR-Val-His-Pro-PHE	50
Asp-Orn-Val-TYR-Val-His-Pro-PHE	20
Asn-D-Arg-Val-TYR-Val-His-Pro-PHE	5
— — — Val-TYR-Val-His-Pro-PHE	1
Asp-Arg-Val-TYR-Val-His-Pro-PHE | NO_2	50

Allman, 1974). Semnificația biologică a complecșilor pe care angiotensina îi formează cu diferiți constituenți chimici celulari rămîne necunoscută.

Page (1974) consideră că *angiotensina are în organism funcții multiple:* reglarea presiunii sanguine și a balanței sodiului, declanșarea hipertensiunii renale, hipersecreția primară de aldosteron, reglarea metabolismului apei (Page propune să fie denumit *hormonul însetării*), o probabilă acțiune asupra sistemului nervos central și rol de *substanță angiotoxică* — responsabilă indirect pentru necrozarea hemoragică a arteriolitelor.

Secretina. Secretina este un hormon care este răspîndit la toate vertebratele și la om și poate fi separată din mucoasa intestinală. Secreția ei poate fi stimulată pe cale chimică prin introducerea de HCl în intestin sau de activitatea chimului care în momentul pătrunderii în duoden are un *p*H cuprins între 3, 4 și 3, 7. Cantitatea de secretină elaborată este independentă de stimularea pe cale nervoasă.

Structura primară a secretinei, care conține 27 resturi de aminoacizi ce aparțin la 11 aminoacizi diferiți este următoarea:

```
His-Ser-Asp-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Glu-Leu-Ser-Arg-Leu-Arg-Asp-Ser-Ala—┐
1          5                  10                  15                 │
                                                                     │
   -Arg-Leu-Gln-Arg-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val                          │
      20                 25      27                                 │
```

Bromer, Sinn și Behrens (1967) atrag pentru prima dată atenția asupra faptului că secvența primilor trei aminoacizi situați la extremitatea N-terminală în secretină este aproape identică cu cea din molecula glucagonului. Ulterior, Jorpes și colab. (1962, 1967) arată că gradul de asemănare între cele două molecule este mult mai mare: 14 din cele 27 resturi de aminoacizi din molecula secretinei sînt situate în aceleași poziții ca și în molecula glucagonului (fig. 2.2).

```
                  1                   5                  10
Secretina (S):    HIS-SER-Asp-GLY-THR-PHE-THR-SER-Glu-Leu-SER-
Glucagon (G):     HIS-SER-Gln-GLY-THR-PHE-THR-SER-Asp-Tyr-SER-
                                15                  20
(S):              -Arg-Leu-Arg-ASP-SER-Ala-ARG-LEU-GLN-Arg-Leu-
(G):              -Lys-Tyr-Leu-ASP-SER-Arg-ARG-Ala-GLN-Asp-Phe-
                        25    27
(S):              -Leu-GLN-Gly-LEU-Val-CO-NH2
(G):              -Val-GLN-Trp-LEU-MET-Asn-Thr
                                    29
```

Fig. 2.2. — Structura primară a secretinei în comparație cu structura primară a glucagonului

Acest fapt îl determină pe Weinstein (1968) să presupună că sinteza acestor două polipeptide cu activitate hormonală diferită, dar cu structură primară apropiată, a avut loc pe două căi diferite sau prin duplicarea unei gene ancestrale comune pentru sistemul glucagon-secretină; ultimul proces ar fi avut loc aproximativ în era mezozoică, acum $2 \cdot 10^8$ ani, sau cel mai tîrziu în era paleozoică.

Pentru activitatea secretinei restul de histidină din poziția 1 este esențial: îndepărtarea lui duce la obținerea unei polipeptide cu o activitate biologică extrem de scăzută (Ondetti, Narayanan, von Saltza, Sheehan, Sabo, Bodanszky, 1968).

Secretina care ajunge în sînge este relativ repede inactivată, deoarece este parțial degradată la nivelul ficatului de către catepsina *C*, din care cauză timpul ei de înjumătățire în organism este relativ scurt, între 15 și 20 minute.

Acțiunea biologică a secretinei este multiplă: mărește consumul de oxigen de către celulele pancreatice, influențînd astfel sinteza și secreția enzimelor pancreatice care s-au dovedit dependente de gradul de oxigenare al țesutului și ca o consecință se mărește și volumul de sînge care irigă pancreasul (Schucher și Hokin, 1954; Hermon-Taylor, 1968). Secretina poate acționa ca inhibitor al gastrinei atît la nivelul situsului receptor al acestui hormon cît și la nivelul celulelor secretoare de gastrină (Hansky, Soveny și Korman, 1971). După alți autori (Mellamby, 1925, 1926) rolul secretinei ar fi de a stimula celulele pancreatice în producerea unei soluții diluate de bicarbonat, care să antreneze cu sine enzimele elaborate de pancreas și să le transporte în lumenul intestinal. Deși elaborată în anii 1925 — 1926 această teorie nu a fost confirmată decît relativ recent (v. Jorpes și Mutt, 1975).

Colecistokinina. Colecistokinina, ca de altfel și secretina, este un hormon elaborat la nivelul intestinului; se pare că partea distală a intestinului, mai săracă în secretină, este sediul unei concentrații mari de colecistokinină.

Colecistokinina este alcătuită din 33 de resturi de aminoacizi și are o masă moleculară de aproximativ 4 000:

Lys-Ala-Pro-Ser-Gly-Arg-Val-Ser-Met-Ile-Lys-Asn-Leu-Gln-Ser-Leu-Asp-
1 5 10 15
-Pro-Ser-His-Arg-Ile-Ser-Asp-Arg-Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH_2
20 25 30 33

Mutt în 1964 a arătat că, oxidarea resturilor de metionină cu apă oxigenată duce la pierderea completă atît a activității colecistokininice cît și a celei pancreoziminice.

Colecistokinina și secretina exercită un pronunțat efect asupra eliberării în intestinul subțire perfuzat a zaharazei, maltazei și lactazei. Colecistokinina este mult mai activă în acest proces decît secretina. Activitatea acestor enzime în mucoasa intestinală rămîne relativ constantă după administrarea colecistokininei (Dyck, Bonnet, Laster, Stinson și Hall, 1974).

Gastrina. Numeroase funcții importante ale aparatului digestiv printre care și secreția gastrică acidă, secreția de pepsină, secreția pancreatică, motilitatea gastrică și intestinală, procesele de absorție sînt influențate de un hormon de natură polipeptidică denumit *gastrină.*

Gastrina este secretată de mucoasa din regiunea antrală a stomacului în cantități relativ mari, în comparație cu alte organe care secretă cantități neînsemnate (vezica biliară, tiroidă, pancreas, mucoasa jejunului și duodenului, esofagul etc.). Blair, Sherratt și Wood (1967)

au arătat că gastrina în celulă este distribuită în principal în nuclei, mitocondrii și microsomi.

Gregory și colaboratorii săi (1964 a — c) de la Universitatea din Liverpool, reușesc să izoleze din mucoasa gastrică din regiunea antrală două polipeptide similare cu acțiune hormonală și să le determine secvența primară, denumindu-le *gastrina I* și *gastrina II*.

Structura gastrinelor izolate de la diferite specii animale și de la om este redată în figura 2.3.

	1				5					10
(a)	Pyr-	Glu-	Gly-	Pro-	Trp-	Val-	Glu-	Glu-	GLU-	Glu-
(b)	Pyr-	Glu-	Gly-	Pro-	Trp-	Met-	Glu-	Glu-	Ala-	Glu-
(c)	Pyr-	Glu-	Gly-	Pro-	Trp-	Leu-	Glu-	Glu-	Glu-	Glu-
(d)	Pyr-	Glu-	Gly-	Pro-	Trp-	Met-	Glu-	Glu-	Glu-	Glu-
(e)	Pyr-	Glu-	Gly-	Pro-	Trp-	Leu-	Glu-	Glu-	Ala-	Glu-

	10					15
(a)	Ala-	Ala-	Tyr-	Gly-	Trp-	Met-	Asp-	Phe-	CO-NH_2
(b)	Ala-	Ala-	Tyr-	Gly-	Trp-	Met-	Asp-	Phe-	CO-NH_2
(c)	Glu-	Ala-	Tyr-	Gly-	Trp-	Met-	Asp-	Phe-	CO-NH_2
(d)	Glu-	Ala-	Tyr-	Gly-	Trp-	Met-	Asp-	Phe-	CO-NH_2
(e)	Glu-	Ala-	Tyr-	Gly-	Trp-	Met-	Asp-	Phe-	CO-NH_2

Fig. 2.3. — Structura comparată a gastrinelor de diferite proveniențe: a — oaie, b — cîine, c — pisică, d — porc, e — om.

După cum se vede toate gastrinele sînt alcătuite dintr-o heptadecapeptidă care la extremitatea N-terminală are un rest de *Glu* sub formă de acid piroglutamic, iar la cea C-terminală, restul ultimului aminoacid *Phe* care se găsește sub formă de amidă, deci gruparea carboxil, este blocată. Gastrinele izolate de la specii diferite se deosebesc între ele prin faptul că în pozițiile 5, 8 și 10 se găsesc resturile unor aminoacizi deosebiți unul de altul (Gregory, Hardy, Jones, Kenner, Sheppard, 1964; Morley, 1971).

În poziția 12 restul de *Tyr* este comun tuturor gastrinelor, și poate fi întîlnit fie sub formă liberă, adică cu gruparea hidroxil neblocată, gastrinele din această categorie purtînd denumirea generică de *gastrina I*, fie sub formă de Tyr-O-SO_3H, cînd gruparea hidroxil a tirozinei este esterificată și gastrinele se numesc *gastrina II*.

Activitatea hormonală a gastrinei este asigurată de prezența în moleculă a tetrapeptidei C-terminale ... Trp-Met-Asp-Phe-CO·NH_2 comună tuturor gastrinelor și denumită de Gregory și Tracy (1964) *fragmentul minimal pentru asigurarea unei activități gastrin-asemănătoare.*

Caeruleina. Caeruleina este o decapeptidă care acționează asupra secreției gastrice și pancreatice la cîine și asupra vezicii biliare la cobai și cîine.

Analoagă ca structură chimică și similară ca activitate biologică cu colecistokinina, caeruleina a fost obținută de Anastasi, Erspamer și Endean (1967), Erspamer și Anastasi (1966), Erspamer și colab. (1966) din pielea de *Hyla caerulea*, un broțăcel australian, din *Leptodactylus pentadactylus labyrinthicus* din America de Sud și *Xenopus laevis*, din Africa de Sud. Studiul structurii ei chimice a evidențiat faptul că șapte din cei zece aminoacizi din care este alcătuită sînt identici cu octapeptida C-terminală a colecistokininei, în poziția

N-terminală este prezent un rest de Glu sub formă de acid piroglutamic, iar Phe-10 se găseşte sub formă de amidă. Structura caeruleinei este următoarea :

$$\begin{array}{ccccccccccc} & & & HO_3S-O & & & & & & & \\ & 1 & & | & 5 & & & & 10 & & \\ \text{piro-Glu-Gln-Asp-Tyr-Thr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-CO.NH}_2 & & & & & & & & & & \end{array}$$

Restul aminoacidului tirozina din poziţia 4 este esterificat, iar în poziţia 5 se găseşte situat un rest de treonină care în colecistokinină este substituit cu un rest de metionină; celelalte resturi de aminoacizi sînt identice în ambii hormoni. A n a s t a s i şi E r s p a m e r au arătat că hidroliza unei tripeptide de la extremitatea N-terminală (piro-Glu-Gln-Asp-) nu duce la o modificare a activităţii hormonale, în schimb esterul sulfuric al *Tyr*-4 pare a fi de o importanţă capitală pentru activitatea polipeptidei.

Bradikinina. Bradikinina este o nonapeptidă alcătuită din resturile a cinci aminoacizi — *Arg*, *Pro*, *Gly*, *Phe* şi *Ser*. Ordinea în care se găsesc situate resturile aminoacizilor în molecula bradikininei are o importanţă deosebită pentru activitatea hormonului, care se manifestă asupra musculaturii netede.

Bradikinina are un efect diferenţiat asupra ţesuturilor : determină o uşoară contracţie caracteristică a ileumului, în timp ce asupra duodenului are o acţiune contrară, de relaxare; măreşte permeabilitatea vasculară prin modificarea permeabilităţii celulelor endoteliale ale peretelui vascular, dilată arteriolele şi are o acţiune constrictoare asupra venelor.

Modificarea structurii primare a moleculei de bradikinină are drept rezultat modificarea activităţii ei miotropice. Structurile primare ale bradikininei şi ale analogilor ei structurali sînt redate în figura 2.4.

Îndepărtarea din bradikinină a restului de *Arg*-1 este însoţită de o scădere puternică a activităţii biologice (1/100 000 faţă de bradikinina intactă), iar hidroliza restului de *Arg*-9 duce la o scădere a activităţii mai puţin marcantă (1/100). De aici s-a tras concluzia că resturile de *Arg*-1 şi *Arg*-9 sînt absolut necesare pentru asigurarea activităţii hormonale. Retrobradikinina, în care ordinea aminoacizilor a fost inversată este o substanţă inactivă cu toate că în structura ei se întîlnesc aceleaşi resturi de aminoacizi, dar în poziţii diferite faţă de molecula nativă : patru resturi—*Phe*, *Ser*, *Gly*, *Pro*-ocupă alte locuri în secvenţa peptidei. Prin substituirea altor resturi de aminoacizi se obţin şi nonapeptidele, analogi structurali ai bradikininei (*c* şi *d*), care sînt inactive.

(a) Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg
1 5 9
(b) Arg-PHE-Pro-SER-Phe-GLY-Pro-PRO-Arg
(c) Arg-GLY-GLY-Gly-Phe-GLY-GLY-Phe-Arg
(d) Arg-Pro-Pro-Gly-GLY-GLY-Pro-GLY-Arg

Fig. 2.4. — Structura primară a bradikininei (a), retrobradikininei (b) şi analogilor lor structurali (c,d).

După S t e w a r t (1971) resturile aminoacizilor *Pro*-3, *Gly*-4 şi *Ser*-6 nu îndeplinesc în moleculă un rol esenţial în procesul de manifestare a activităţii biologice, însă ele spaţiază, la distanţe bine definite, resturile aminoacizilor esenţiali pentru hormon. Această spaţiere este realizată de o manieră bine precizată deoarece substituirea acestor aminoacizi cu resturile unor aminoacizi cu catenă mică nu duce la pierderea activi-

tăţii sau la o diminuare a acesteia, dar înlocuirea lor cu resturi de aminoacizi cu catenă mare duce la distrugerea activităţii hormonului. Pe de altă parte, omisiunea din molecula bradikininei a resturilor de *Gly*-4 şi *Ser*-6 sau *Pro*-3 dă naştere la analogi structurali inactivi, sau în cazul *Pro*-2 sau *Pro*-3 cu activitate care reprezintă numai 1/20 din activitatea bradikininei native. Stewart crede că rolul îndeplinit de *Gly*-4 şi *Ser*-6 se rezumă la asigurarea formării complexului hormon-receptor, condiţionat de configuraţia spaţială a ambelor componente ale complexului.

Polipeptida care inhibă secreţia gastrică *(GIP- gastric inhibitory polypeptide)* a fost izolată pentru prima dată de Brown în 1971 care ulterior în 1972 împreună cu Pederson au arătat că această polipeptidă inhibă *secreţia acidă a stomacului*, stimulată de pentagastrină şi de diclorhidratul de histamină : anulează, de asemenea, şi *hipoglicemia provocată de insulină*. GIP inhibă, de asemenea, secreţia de pepsină stimulată de stările hipoglicemice provocate de insulină. *In vivo GIP* a fost identificată în celulele de D_1 ale duodenului şi intestinului subţire şi în serul sanguin în care prin metode radioimunologice a fost decelată, în concentraţii extrem de mici, (200 pg/ml). Este interesant de remarcat faptul că în primele 45 minute, după ingerarea alimentelor, *GIP* imunoreactivă creşte rapid ajungînd la concentraţii de 1 ng/ml, după care revine la normal în cursul următoarelor 4 — 5 ore.

Brown şi Dryburgh (1971) stabilesc structura primară a polipeptidei care inhibă secreţia gastrică şi arată că este formată din 43 resturi de aminoacizi, are o masă moleculară de 5 100 daltoni şi prezintă multe asemănări structurale cu secretina şi glucagonul :

Tyr-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala-Met-Asp-Lys-
1 5 10 15
-Ile-Arg-Gln-Gln-Asp-Phe-Val-Asn-Trp-Leu-Leu-Ala-Gln-Gln-Lys-Gly-
20 25 30
-Lys-Lys-Ser-Asp-Trp-Lys-His-Asn-Ile-Thr-Gln
35 40 43

Brown în 1974 crede că GIP este de fapt una şi aceeaşi substanţă cu enterogastrona descrisă de fiziologi în anul 1930.

Motilina a fost semnalată pentru prima dată de Brown, Johnson şi Magee (1966) care au observat că alcalinizarea duodenului de cîine are drept urmare o creştere a activităţii motorii a stomacului denervat sau transplantat şi denervat. O acţiune similară o aveau şi preparatele crude de pancreozimină şi extractele duodenale proaspete. Acţiunea ultimelor depindea de valoarea *p*H duodenal : la *p*H scăzut (deci în mediu acid) activitatea motorie a stomacului este inhibată, în timp ce la *p*H ridicat (deci în mediu alcalin) este stimulată.

În 1972 Brown, Cook şi Dryburgh (*a* şi *b*) reuşesc să izoleze şi să purifice o polipeptidă care are acelaşi efect fiziologic şi să-i stabilească structura chimică, arătînd că este alcătuită din 22 resturi de amino-

acizi şi are o masă moleculară de 2 700. Structura primară a motilinei este următoarea:

Phe-Val-Pro-Ile-Phe-Thr-Tyr-Gly-Glu-Leu-Gln-Arg-Met-Gln-Glu-
1 5 10 15
Lys-Glu-Arg-Asn-Lys-Gly-Gln.
20 22

Peptida intestinală vasoactivă (*VIP — vasoactive intestinal peptide*) izolată din intestinul subţire de porc şi de pui (Said şi Mutt, 1972) este constituită din 28 resturi de aminoacizi şi structura ei primară a fost confirmată pe cale de sinteză (Bodanszky, Klausner, Said, 1973) activitatea biologică intensificîndu-se pe măsură ce catena polipeptidică se alungeşte. Izolată pentru prima dată sub formă de extract de către Said şi Mutt (1970), *VIP* s-a dovedit o polipeptidă cu acţiuni multiple şi diversificate, deci cu un spectru larg de acţiune care afectează funcţiile cardiovasculare, respiratorii şi metabolice.

Said (1974) menţionează că această peptidă este inactivă la nivelul ficatului şi în mod normal activitatea ei se limitează la tubul digestiv, la ficat şi circulaţia portală.

Secvenţa primară a VIP este:

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-
1 5 10 15
-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn-NH_2
20 25 28

Polipeptida pancreatică bovină (***BPP***—*bovine pancreatic polypeptide*) şi ***Polipeptida pancreatică de păsări*** (***APP*** — *avian pancreatic polypeptide*) au fost izolate în anul 1974 (citat după Lin, Chance, 1974) de către Chance şi alţii din pancreasul de bovine şi de pui şi s-au dovedit a fi două polipeptide omoloage avînd 16 resturi de aminoacizi identice din cele 36 de resturi de aminoacizi care alcătuiesc molecula acestor polipeptide. Chance şi alţii (1974) izolează peptide similare ca structură şi proprietăţi şi din pancreasul de om, oaie şi cal, care diferă de cele izolate de la bou şi de la pui prin cel mult 1 — 2 resturi de aminoacizi.

Polipeptida pancreatică bovină are acţiune bifazică asupra pancreasului: la început stimulează secreţia de apă şi bicarbonaţi, secreţie indusă de secretină, după care urmează o inhibiţie; secreţia de proteine şi amilază este, de asemenea, inhibată în cursul acestui proces. Rolul fiziologic al acestor polipeptide pancreatice este încă necunoscut. Structurile lor primare sînt redate comparativ în figura 2.5.

(a) BPP: Ala-PRO-Leu-Glu-PRO-Gln-TYR-PRO-GLY-ASP-ASP-ALA-
1 5 10
(b) APP: Gly-PRO-Ser-Gln-PRO-Thr-TYR-PRO-GLY-ASP-ASP-ALA-
(a) -Thr-Pro-GLU-Gln-Met-Ala-Gln-Tyr-Ala-Ala-Glu-LEU-
15 20
(b) -Pro-Val-GLU-Asp-Leu-Ile-Arg-Phe-Tyr-Asp-Asn-LEU-
(a) -Arg-Arg-TYR-Ile-ASN-Met-Leu-THR-ARG-Pro-ARG-TYR-NH_2
25 30 35 36
(b) -Gln-Gln-TYR-Leu-ASN-Val-Val-THR-ARG-His-ARG-TYR-NH_2

Fig. 2.5. — Structurile primare comparate ale polipeptidei pancreatice bovine (*BPP*) şi ale polipeptidei pancreative de pasăre (*APP*)

Glucagonul. Glucagonul sau *factorul hiperglicemiant-glicogenolitic* a fost pus în evidenţă încă din anul 1923, cînd s-a constatat că extractele pancreatice injectate animalelor de laborator provoacă creşterea glicemiei sanguine.

Relativ recent, glucagonul a fost purificat şi cristalizat din extractele pancreatice, demonstrîndu-se că este de fapt o polipeptidă, cu o masă moleculară de 3 480, care conţine 29 resturi de aminoacizi, înlănţuiţi succesiv într-o singură catenă polipeptidică liniară.

Secvenţa aminoacizilor în molecula glucagonului izolat din pancreasul de bovine şi porcine, astăzi cunoscută datorită lucrărilor lui B r o m e r şi a l ţ i i (1957 a — d; 1971) este următoarea:

His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-
1 5 10 15
-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr
20 25 29

Injectat în sistemul portal animalelor de laborator, glucagonul produce o pronunţată hiperglicemie. Efectul hiperglicemiant observat *in vivo* (pisică, iepure), precum şi acţiunea glicogenolitică constatată în experienţele *in vitro*, întăresc ideea că glucagonul reactivează fosforilaza hepatică ceea ce are drept consecinţă o creştere a vitezei de transformare a glicogenului hepatic în glucozo-fosfat. Acest compus trece ulterior în glucozo-6-fosfat şi în final în glucoză liberă.

N o e şi B a u e r (1971) au demonstrat folosindu-se de triptofan marcat cu tritiu, că *in vitro* insulele lui L a n g e r h a n s elaborează un precursor al glucagonului cu o masă moleculară de aproximativ 9 000 şi care poate încorpora glucagonul. Procesul de încorporare în glucagon a precursorului este inhibat de cicloheximidă şi de incubarea celulelor la temperaturi mari. După incubarea precursorului cu tripsină şi separarea produselor de hidroliză pe o coloană de Sephadex, autorii au constatat o creştere a radioactivităţii glucagonului rezultat şi o reacţie mai intensă cu antiserul specific pentru glucagon. Pe această bază N o e şi B a u e r ajung la concluzia că sinteza glucagonului se realizează prin intermediul unui *proglucagon* (masă moleculară 9 000), moleculă inactivă care prin proteoliză dă naştere glucagonului (masă moleculară aprox. 3 500) activ.

Hormonul adrenocorticotrop, corticotropina (ACTH) este o polipeptidă secretată de celulele acidofile ε din adenohipofiză şi care acţionează asupra glandei suprarenale, stimulînd sau inhibînd creşterea ei şi secreţia de hormoni corticosteroizi.

Hormonul adrenocorticotrop a fost izolat din hipofiza mai multor specii de animale şi de la om (L i, D i x o n, C h u n g, 1958; L e e şi a l ţ i i, 1974) şi s-a dovedit a fi o polipeptidă liniară, alcătuită din resturile a 39 de aminoacizi şi avînd o masă moleculară de 4 500 (B r o w n, D a v i e s, E n g l e r t, C o x, 1956).

În molecula hormonului se constată existenţa a două zone distincte: una cu caracter acid, în care predomină resturile de acid glutamic şi aspartic (25—33) şi alta cu caracter bazic, condiţionată de prezenţa unui fragment alcătuit din două resturi de arginină şi două de lizină (15—18)

(fig. 2.6). S-a stabilit că indiferent de specia de la care a fost obținut hormonul adrenocorticotrop, aminoacizii din pozițiile 1—13 sînt aceiași, nouă resturi de aminoacizi situați în pozițiile 25—33 variază cu specia, după care urmează din nou un fragment, 34—39 care este comun pentru hormonii extrași din hipofiza diferitelor animale (S h e p h e r d și alții,

		1	5	10
ACTH-uman	(1):	Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Gly-		
ACTH-bovin	(2):	Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-		
ACTH-rechin	(3):	Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-		

	15	20	25
(1):	-Lys-Lys-Pro-Val-Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Val-Val-Tyr-Pro-Pro-		
(2):	-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Val-Lys-Val-Tyr-Pro-Asp-		
(3):	-Pro-Met-Gly-Arg-Lys-Arg-Arg-Pro-Ile-Lys-Val-Tyr-Pro-Asn-		

	30	35	39
(1):	-Asp-Asp-Ser-Gly-Glu-Glu-Glu-Ala-Ala-Ala-Phe-Leu-Glu-Phe		
(2):	-Gly-Glu-Ala-Glu-Asp-Ser-Ala-Gln-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu-Phe		
(3):	-Ser-Phe-Glu-Asp-Glu-Ser-Val-Glu-Asn-Met-Gly-Pro-Glu-Leu		

Fig. 2.6. — Structura moleculelor de *ACTH* de diferite proveniențe și gradul lor de asemănare. În moleculele de *ACTH* extrase din hipofiza de bou și de rechin sînt scrise cu litere aldine, resturile aminoacizilor care sînt diferite de resturile aminoacizilor din aceeași poziție din molecula *ACTH* uman.

1956 *a*, *b*; L i, D i x o n, C h u n g, 1958; L e e, L e r n e r, B u e t t n e r-J a n u s c h, 1959). De asemenea, s-a demonstrat că primii 23 de aminoacizi sînt esențiali pentru activitatea fiziologică a hormonului. Această afirmație este sprijinită și de faptul că H o f m a n n, Y a j i m a (1961) și Y a n a i h a r a, L i u și L a n d e (1961) reușesc să sintetizeze o polipeptidă alcătuită din 23 de aminoacizi, cu o masă moleculară de 3 200 daltoni, care posedă aceiași activitate biologică ca hormonul adrenocorticotrop natural.

De remarcat faptul că secvența primilor 13 aminoacizi din molecula ACTH și din hormonul melanocitostimulator (v. mai departe) este aceiași, ceea ce explică, probabil, faptul că ACTH și β-MSH au efecte comune asupra pigmentării melanocitelor și a mecanismelor de comportament ale animalelor.

D e W i e d și W e i j n e n (1970) au arătat totuși că în unele cazuri preparatele de hormon adrenocorticotrop sînt hidrolizate cu formarea unei polipeptide de dimensiuni mici, care conține resturile aminoacizilor din pozițiile 4—10. Aceasta își păstrează capacitatea de a media reacțiile adaptative ale animalului, reacții care îi permit acestuia să-și mențină integritatea individuală pe calea instaurării unor comportamente adecvate.

Din lobul intermediar al hipofizei de rechin (L o w r y și a l ț i i, 1974) au reușit că izoleze ACTH și o peptidă corticotropin-asemănătoare și au arătat că ACTH de rechin este alcătuit din 39 resturi de aminoacizi și se deosebește de cel al mamiferelor prin 11 poziții ale aminoacizilor în lanțul polipeptidic din care numai două sînt situate în regiunea „steroidogenă" 1—19. Primii 13 aminoacizi se confundă ca ordine cu cei de la extremitatea N-terminală a α-MSH, iar așezarea aminoacizilor în catenă este identică cu cea din ACTH pe porțiunea resturilor aminoaci-

zilor din pozițiile 18—39. Lowry și alții (1974) consideră că ACTH este un precursor biochimic al α-MSH.

Cromatografia pe coloană de Sephadex G-50 a permis izolarea a trei forme de ACTH: *big* ACTH, $ACTH^{1-39}$ (forma obișnuită, normală) și ACTH intermediar, cu o masă moleculară situată între a *big* ACTH și $ACTH^{1-39}$.

Coslovsky și Yalow (1974) semnalează că în hipofiza de cobai, pisică, cîine, oaie, maimuță și om predomină $ACTH^{1-39}$ și glandele suprarenale ale acestor animale elaborează și elimină în principal hidrocortizon în timp ce în hipofiza de iepure, șobolan și șoarece predomină ACTH intermediar, iar suprarenalele acestor animale elaborează cu precădere sau în exclusivitate (uneori) corticosteron. Alte animale, de exemplu, bovinele au în hipofiză concentrații egale $ACTH^{1-39}$, ACTH intermediar și suprarenalele lor elaborează cantități egale de hidrocortizon și corticosteron. O excepție de la această „regulă" o constituie hamsterul auriu la care în hipofiză este prezent ACTH intermediar, iar glandele lui suprarenale elaborează numai hidrocortizon.

Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Arg-
1 5 10 15
-Arg-Pro-Val-Lys-Val-Tyr-Pro-ASP-ALA-GLY-GLU-ASP-GLU-SER-ALA-GLU-Ala-
20 25 30
-Phe-Pro-Leu-Glu-Phe
35 39

Secvența primară a hormonului adrenocorticotrop uman a fost stabilită de Lee (1961) și s-a dovedit că succesiunea resturilor de aminoacizi din pozițiile 25—33 redate cu litere majuscule, variază în funcție de specie, iar resturile din pozițiile 1—13 au aceeași secvență ca în preparatele hormonului α-melanocitostimulator.

În experiențe *in vitro* s-a semnalat că ACTH are o acțiune lipolitică în țesutul adipos incubat cu albumină. Această acțiune este similară cu cea produsă de adrenalină, dar diferă de aceasta prin faptul că nu se manifestă decît în prezența ionilor de calciu. După unii autori ionii de calciu sînt necesari și pentru acțiunea ACTH asupra glandelor suprarenale. Efectul lipolitic al ACTH asupra țesutului adipos, în experiențe *in vitro* este diminuat sau chiar anulat de către glucoză (Lopez, White și Engel, 1959).

Hormonul adrenocorticotrop joacă un rol important în menținerea homeostaziei, permițînd adaptarea organismului la cei mai diferiți stimuli externi (traumatismul, șocuri psihice, intoxicații, frigul, căldura, foamea etc.).

În 1953 Mirsky, Miller și Murphy au semnalat pentru prima dată că hipofiza intervine în comportamentul animal. Ulterior, numeroși cercetători (Kastin, Ader, Weiss, Levine și îndeosebi școala condusă de olandezul De Wied) au studiat elaborarea reflexelor condiționate de apărare, la șobolani („*conditioned avoidance response*") încercînd să elucideze rolul unor peptide hipofizare în acest proces. De Wied, Weijnen, Moleman, Bohus și alții, la Utrecht, după numeroase studii și încercări care au durat peste 15 ani au arătat următoarele:

a. ACTH, α-MSH și β-MSH intervin în procesul de elaborare a comportamentului la animalele de laborator; îndepărtarea hipofizei inhibă

β-MSH Ala-Glu-Lys-Lys-Asp-Glu-Gly-Pro-Tyr-Arg-**MET-GLU-HIS-PHE-ARG-TRP-GLY**-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp
1 5 10 11 12 13 14 15 16 17 20 22

α-MSH $H_3C-C(=O)-NH$-*Ser-Tyr-Ser*-**MET-GLU-HIS-PHE-ARG-TRP-GLY**-*Lys-Pro-Val*
4 5 6 7 8 9 10 13

CTHA *Ser-Tyr-Ser*-**MET-GLU-HIS-PHE-ARG-TRP-GLY**-*Lys-Pro-Val*-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg-
4 5 6 7 8 9 10 15

-Pro-Val-Lys-Val-Tyr-Pro-Asp-Gly-Ala-Glu-Asp-Gln-Leu-Ala-Glu-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu-Phe
20 25 30 35 39

Fig. 2.7 — Hormonii ACTH, β-MSH și α-MSH conțin secvențe de aminoacizi comune. Cercetări recente au evidențiat faptul că hexapeptida 11—17 din β-MSH și 4—10 din α-MSH și ACTH joacă un rol deosebit în elaborarea reflexului condiționat de apărare și a unui comportament adecvat.

elaborarea reflexului condiționat de apărare sau îl întîrzie foarte mult, totodată conducînd și la o pierdere mai rapidă a reflexului instaurat. Aceste inconveniente observate pe animale hipofizectomizate pot fi remediate dacă șobolanilor li se administrează ACTH, α-MSH sau β-MSH.

b. Procedînd la hidroliza enzimatică a celor trei hormoni, autorii au demonstrat că numai hexapeptida alcătuită din resturile -Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly- este secvența activă, absolut necesară pentru elaborarea reflexului condiționat de apărare și în consecință a unui comportament adecvat (fig. 2.7).

c. Utilizarea unor peptide de sinteză a relevat faptul că și această hexapeptidă nu este în întregime necesară pentru elaborarea unui comportament. Este suficientă tetrapeptida -Met-Glu-His-Phe- pentru a obține un rezultat identic în elaborarea comportamentului animal; dacă *L*-Phe este substituit în tetrapeptidă cu *D*-Phe activitatea tetrapeptidei este inversată — duce la „ștergerea" comportamentului elaborat; substituirea celorlalți *L*-aminoacizi cu *D*-aminoacizi nu are nici un fel de efect asupra activității tetrapeptidei; substituirea în poziția 8 a *L*-Arg cu *L*-Lys nu are efect asupra activității hexapeptidei, dar introducerea *D*-Lys duce la o creștere a activității; înlocuirea *L*-Trp cu *L*-Phe duce la oxidarea metioninei din poziția 4 și la o creștere substanțială a activității hexapeptidei. Aceste modificări cumulate duc la obținerea unei hexapeptide cu structura:

Met-Glu-His-Phe-*D*-Lys-Phe
4 5 6 7 8 9

a cărei activitate este de 1 000 de ori mai mare față de hexapeptida de la care s-a plecat;

d. În cazul animalelor hipofizectomizate, pentru menținerea capacității de elaborare a reflexului condiționat de apărare și pentru fixarea lui este necesară administrarea permanentă de ACTH. Dacă animalelor li se administrează o singură dată o injecție cu Lys-vasopresină se obține același rezultat,

ceea ce înseamnă că Lys-vasopresina este mult mai eficientă decît ACTH (secvența 4—10).

e. Din hipofiză au fost separate noi peptide a căror structură nu se cunoaște încă. Printre peptidele izolate s-a identificat o Lys-vasopresină din care lipsește restul Gly ce se găsea sub formă de amidă. Această desglicinamid-Lys-vasopresină nu influențează tensiunea și metabolismul apei în organism însă este mult mai specifică în elaborarea procesului comportamental decît preparatul obișnuit de Lys-vasopresină.

Rolul pe care îl îndeplinesc diferite polipeptide hipofizare în elaborarea comportamentului animal și elucidarea mecanismului de acțiune al acestora va întregi, probabil, cunoștințele noastre despre funcțiile hipofizei la vertebrate, modificînd, totodată, conceptele actuale despre biochimia și fiziologia acestor substanțe.

Hormonul melanocitostimulator (MSH). Intermedina, melanotropina sau hormonul melanocitostimulator a fost izolat din hipofiza diferitelor animale și structura lui chimică a fost complet stabilită.

β-melanotropina sau hormonul β-melanocitostimulator (β-MSH) izolată din hipofiza de porc este o polipeptidă formată din 18 resturi de aminoacizi, are o masă moleculară de peste 2 000 și injectarea ei la animalele poikiloterme determină dilatarea melanoporilor care conțin melanine. β-MSH se aseamănă cu hormonul adrenocorticotrop, avînd o bază structurală comună (fig. 2.8). Deoarece și hormonul adrenocorticotrop acționează asupra melanoforilor se presupune că, pentru activitatea hormonală sînt necesare resturile aminoacizilor din pozițiile 7—13 care sînt identice și comune ambilor hormoni. β-MSH izolat de la bovine se deosebește de cel de la porc prin faptul că acidul glutamic din poziția 2 este înlocuit de un rest de serină și prin aceea că are o activitate hormonală de 2,5 ori mai mică.

Secvența și compoziția în aminoacizi în diferite molecule de β-MSH izolate de la maimuță, ovine, porcine, cabaline variază în limite restrînse. După cum se vede din figura 2.8 numai β-MSH izolat de la om se deosebește semnificativ de preparatele hormonale obținute din pars intermedia a altor animale.

α-Melanotropina sau hormonul α-melanocitostimulator separat din hipofiza animală este, de asemenea, o polipeptidă alcătuită din 13 resturi de aminoacizi și se deosebește de β-MSH izolat de la porc prin prezența serinei sub formă acetilată la extremitatea N-terminală și prin faptul că la extremitatea C-terminală, valina este prezentă sub forma unei amide. α-MSH obținut din hipofiza de porc este un tridecapeptidamid și în preparatele din hipofiza de bou, cal, maimuță, oaie nu prezintă variații structurale (Lee, Lerner, Buettner, Janusch, 1963).

Lowry și Chadwick (1970) izolează de la rechini un hormon melanocitostimulator alcătuit din 11 resturi de aminoacizi.

Bennett și alții (1974) izolează din lobul intermediar de rechin *Squalus acanthias* un MSH alcătuit din 16 resturi de aminoacizi :

Asp-Gly-Asp-Asp-Tyr-Lys-Phe-Gly-His-Phe-Arg-Trp-Ser-Val-Pro-Leu
1 5 10 16

Fig. 2.8. — Structura primară a diferitelor preparate de α- și β-MSH în comparație cu un fragment din molecula de ACTH

Denumirea hormonului și sursa de izolare a lui	Secvența aminoacizilor
α-MSH izolat de la oaie, porc, bou, cal și maimuță	$H_3C-\overset{O}{\overset{\|}{C}}$-HN-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-CO-NH_2 1 5 10 13
β-MSH-uman	Ala-Glu-Lys-Lys-Asp-Glu-Gly-Pro-Tyr-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp 1 5 10 15 20 22
β-MSH de maimuță	Asp-Glu-Gly-Pro-Tyr-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp 1 5 10 15 18
β-MSH de cal	Asp-Gly-Gly-Pro-Tyr-Lys-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Arg-Lys-Asp
β-MSH de bou	Asp-*Ser*-Gly-Pro-Tyr-Lys-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp 1 5 10 15 18
β-MSH de porc	Asp-*Ser*-Gly-Pro-Tyr-Lys-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp 1 5 10 15 18
ACTH uman (fragment)	Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-Gly ... 1 5 10

Secvențele scrise cu litere groase sînt comune pentru toți hormonii din tabel. β-MSH uman conține în plus față de preparatele lui obținute de la animale o tetrapeptidă situată la extremitatea N-terminală. Celelalte preparate de β-MSH au la ambele extremități cîte un rest Asp indiferent de proveniența lor.

Aminoacizii din pozițiile 4—10 din α-MSH, 11—17 din β-MSH uman și 7—13 din β-MSH de la maimuță, bou, cal și porc sînt identici cu aminoacizii secvenței 4—10 din preparatele de ACTH, ceea ce explică activitatea intrinsecă melanocitostimulatoare a ACTH. (Rolul acelorași resturi de aminoacizi în comportamentul animal v. la ACTH.)

pe care-l consideră un β-MSH, dar care din heptapeptida comună tuturor preparatelor de β-MSH, ACTH și factorii lipotropi nu conține decît patru resturi de aminoacizi -His-Phe-Arg-Trp- comuni cu aceasta, restul fiind deosebiți. Aceiași autori au demonstrat că și preparatele de α-MSH obținute din hipofiza de rechin sînt deosebite de cele izolate de la mamifere: aminoacidul de la extremitatea N-terminală este amidat numai în proporție de 50%; este alcătuit tot din 13 resturi de aminoacizi, dar secvența lor este deosebită de cea întîlnită la mamifere.

Tirocalcitonina. În 1962 C o p p descoperă un hormon hipoglicemiant pe care îl denumește *calcitonina* și atribuie secreția acesteia glandelor paratiroide. Cercetările ulterioare au demonstrat că acest hormon era de fapt secretat de celulele parafoliculare sau celulele *C* ale glandei tiroide din care cauză hormonul a fost denumit imediat *tirocalcitonina*.

În figura *2.9* sînt redate comparativ structurile primare ale tirocalcitoninelor izolate de la bovine, porcine, ovine, somon și de la om.

```
                1                   5                   10
Om      (a) :  Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Met-Leu-Gly-Thr-Tyr-Thr-
Bou     (b) :  Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Ser-Ala-Tyr-Trp-
Porc    (c) :  Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Ser-Ala-Tyr-Trp-
Oaie :  (d) :  Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Ser-Ala-Tyr-Trp-
Somon   (e) :  Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Gly-Lys-Leu-Ser-

                15                  20                  25
        (a) :  -Gln-Asp-Phe-Asn-Lys-Phe-His-Thr-Phe-Pro-Gln-Thr-Ala-
        (b) :  -Lys-Asp-Leu-Asn-Asn-Tyr-His-Arg-Phe-Ser-Gly-Met-Gly-
        (c) :  -Arg-Asn-Leu-Asn-Asn-Phe-His-Arg-Phe-Ser-Gly-Met-Gly-
        (d) :  -Lys-Asp-Leu-Asn-Asn-Tyr-His-Arg-Tyr-Ser-Gly-Met-Gly-
        (e) :  -Gln-Glu-Leu-His-Lys-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-

                    30      32
        (a) :  -Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro
        (b) :  -Phe-Gly-Pro-Glu-Thr-Pro
        (c) :  -Phe-Gly-Pro-Glu-Thr-Pro
        (d) :  -Phe-Gly-Pro-Glu-Thr-Pro
        (e) :  -Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro
```

Fig. 2.9. — Asemănările structurale ale diferitelor calcitonine izolate de la bou, porc, oaie, somon și de la om.

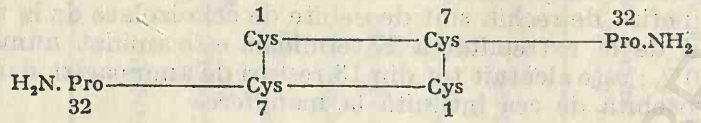
Structura calcitoninei a fost confirmată prin sinteză în laborator (R i t t e l și a l ț i i, 1968; S i e b e r și c o l a b., 1968).

P o t t s și N i a l (1970) au arătat că resturile de cisteină din pozițiile 1—7, de tirozină (12) și triptofan (13) sînt esențiale pentru activitatea biologică a acestui hormon (fig. *2.9*). Importante sînt de asemenea și restul de metionină din poziția 25, precum și prezența prolinei la extremitatea C-terminală sub formă de prolinamidă.

N e h e r (1968 *b*) izolează tirocalcitonina din tumoarea canceroasă tiroidiană și reușește să demonstreze că hormonul uman este prezent sub două forme:

— *forma monomeră*, denumită și *calcitonina M* care în principiu nu diferă structural de calcitonina izolată de la animale — are tot 32 resturi de aminoacizi, o punte disulfurică între resturile de Cys din pozițiile 1—7 și restul de prolinamidă în poziția 32;

— *forma dimeră*, denumită şi *calcitonina D* care rezultă prin legarea antiparalelă a monomerilor prin intermediul unor legături covalente ce iau naştere între resturile Cys-1 ale unui monomer şi 7 ale celui de al doilea monomer :



Dimerul calcitoninei disociază uşor în soluţii tampon cu formarea monomerilor corespunzători. Disociaţia este mediată de prezenţa în tampon a albuminei serice bovine. Dimerul calcitoninei nu este considerat în prezent o *formă prohormonală*, deoarece nu a putut fi izolat din tiroida altor animale. Prezenţa lui în cancerul tiroidian poate fi pusă mai degrabă în legătură cu modificările patologice pe care le suferă tiroida. Totuşi, Roos, Okano şi Deftos (1974) au demonstrat folosind metoda radioimunologică că în mod normal calcitonina este secretată sub formă de *procalcitonină*, dar structura primară şi deosebirile ei faţă de calcitonină nu au fost studiate.

2.2.3.2. Polipeptide naturale ciclice alcătuite din L-aminoacizi

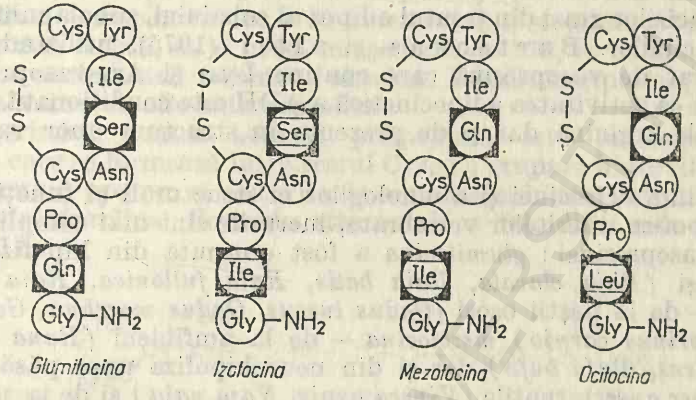
Vasopresina şi ocitocina. Lobulp osterior al glandei hipofize—neurohipofiza sau *pars nervosa* — eliberează doi hormoni de natură peptidică — *vasopresina* şi *ocitocina* — care au o structură chimică apropiată, însă acţiuni fiziologice diferite. Mulţi cercetători sînt de părere că aceşti hormoni sînt eliberaţi în hipotalamus, iar neurohipofiza este numai organul în care sînt depozitaţi (Acher, 1963). Într-adevăr aceşti doi hormoni sînt secretaţi de neuronii modificaţi situaţi la nivelul nucleelor supraoptic şi paraventricular din hipotalamus. Neurosecreţia acestor nuclei este transportată de-a lungul axonilor care ajung în capilarele sanguine din *pars nervosa*.

Ambii hormoni ai neurohipofizei sînt peptide alcătuite din cîte nouă resturi de aminoacizi; resturile primilor şase aminoacizi sînt legate între ele printr-o punte disulfurică la care participă Cys_1—Cys_6 (du Vigneaud şi colab. 1954, 1957, 1958; Fromageot şi alţii, 1953). Acher (1971) a arătat că aceste peptide cu acţiune hormonală sînt secretate de hipofiza diferitelor clase de vertebrate — peşti cartilaginoşi, peşti osoşi, reptile, păsări, mamifere — şi structura lor variază în limita a 1—2 resturi de aminoacizi. Modificările structurale care diferenţiază hormonii neurohipofizari ai vertebratelor se întîlnesc întotdeauna în două poziţii „privilegiate" ale lanţului peptidic, în particular în poziţiile 4 şi 8, în cazul ocitocinei şi 3 şi 8 — în cel al vasopresinei (fig. 2.10) (Acher, Chauvet, Lenci, 1958; Chauvet, Chauvet, Acher, 1963).

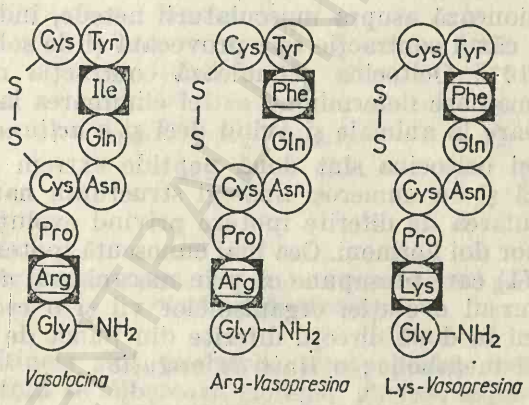
Vasopresina izolată din hipofiza de cîine, cal, oaie, bou, cămilă, maimuţă şi om conţine în structura lui, în poziţia 8 arginină, iar cel preparat din glande de porc-lizină —, din care cauză aceste preparate, deşi au o activitate hormonală identică, au fost denumite *lizin-vasopresină* şi respectiv *arginin-vasopresină*.

Vasotocina este secretată de neurohipofiza vertebratelor inferioare — pești cartilaginoși și ososi, amfibieni, reptile, păsări — și a fost identificată la reprezentanții subclaselor și ordinelor *Hipotremata*, *Palaeopterygii*, *Neopterigii*, *Crossopterigii*, *Anura*, *Ophidia*, *Galliformes*, în timp ce *arginin-vasopresina* a fost izolată, în general de la mamifere (oaie, bou, cal, balenă, om), iar *lizin-vasopresina* numai de la un singur mamifer — de la porc (fig. *2.10*).

Injectată omului în doze foarte mici (0,0001 mg) vasopresina are un efect antidiuretic : volumul urinei eliminate din organism este mai mic



a



b

Fig. 2.10. — Structura primară comparată a hormonilor neurohipofizari de diferite proveniențe :
a — ocitocina și analogii ei structurali ; *b* — vasopresina și analogii ei structurali izolați de la diferite animale.

decît în mod normal, însă aceasta este mai concentrată, deoarece conține cantități mai mari de cloruri, fosfați și substanțe azotoase-uree, creatinină ș.a. Acțiunea antidiuretică a vasopresinei se exercită la nivelul rinichiului unde intervine în procesul resorbției apei.

Insuficiența secretorie a neurohipofizei, cînd adenohipofiza este intactă, are drept consecință apariția și dezvoltarea unor stări patologice dintre care cea mai tipică este *diabetul insipid* (sau diabetul nezaharat) care se caracterizează prin *poliurie* : — volumul urinei eliminate timp de 24 ore, de un om bolnav, variază între 5—20 l. Eliminarea masivă a apei din organism se datorește faptului că procesul de resorbție la nivelul rinichiului este deficitar. După 24 ore de la instalarea poliuriei apare starea de *polidipsie*, cînd bolnavul are o sete nepotolită și consumă un volum mare de apă.

Hormonul antidiuretic (ADH) are și o acțiune lipolitică, determinînd eliberarea acizilor grași din țesutul adipos al cobaiului, șobolanului, porumbelului și cîinilor. Bartsokas și alții (1975), utilizînd *pitressin* (un preparat de vasopresină care conține Lys- și Arg-vasopresină) au demonstrat că activitatea adipocinetică a ADH este condiționată nu numai de restul de arginină dar și de prezența în structura unor vasopresine a ornitinei.

În privința ocitocinei și a omologilor ei structurali și funcționali izolați din hipofiza diferitelor vertebrate, lucrurile sînt mai complicate decît în cazul vasopresinei : *glumitocina* a fost obținută din hipofiza peștilor cartilaginoși *(Raia clavata, Raia batis, Raia fullonica, Raia naevus)*, *izotocina* — de la peștii ososi *(Gadus luscus, Gadus morrhua, Germo alla-lunga, Cyprinus carpio)* *mezotocina* — de la amfibieni *(Rana esculenta, Rana pipiens, Bufo bufo)* dar și din neurohipofiza unor păsări *(Gallus gallus, Anser anser)*, reptile *(Vipera aspis, Naja naja)* și de la unii reprezentanți ai familiei Dipnoi *(Protopterus annectens, Protopterus dolloi)*.

Ocitocina acționează asupra musculaturii netede, îndeosebi a musculaturii uterului a cărui contracție este provocată și de soluții de ocitocină diluate de 1×10^{-7}. Ocitocina stimulează contracția musculaturii din jurul alveolelor mamare determinînd astfel eliminarea laptelui din canalele glandei mamare la animale și avînd deci și o *acțiune lactogogă*.

Vasopresina și ocitocina sînt două peptide extrem de apropiate ca structură chimică și cu numeroși analogi structurali naturali, fapt ce a determinat formularea de diferite ipoteze privind evoluția viețuitoarelor și structura acestor doi hormoni. Cea mai cunoscută ipoteză este cea emisă de Acher (1971) care presupune că prin mecanismul *duplicării genetice* s-a realizat în cursul evoluției organismelor vii și o *evoluție moleculară* a acestor hormoni în două direcții diferite din punct de vedere al structurii și al rolului metabolic : o *linie de evoluție*

vasotocină→vasopresină

compuși care participă la reglarea metabolismului hidromineral și care alcătuiesc grupa hormonilor neurohipofizari în care substituțiile resturilor de aminoacizi au loc întotdeauna în pozițiile 3 și 8 ale nonapeptidei și a *doua linie de evoluție*

izotocină→mezotocină→ocitocină

compuși care participă la funcțiile de reproducere ale organismului și în care substituțiile se efectuează în moleculă, în cursul evoluției, numai în pozițiile 4 și 8. Studiile efectuate pe cei peste 200 de analogi struc-

turali ai acestor doi hormoni neurohipofizari, obținuți pe cale sintetică, au demonstrat că substituirea resturilor de aminoacizi din pozițiile 4 și 8 se realizează fără o pierdere însemnată a activității biologice. Cu toate acestea nu se știe nici astăzi de ce în organismele vii se întîlnesc numai șapte nonapeptide care au și activitate hormonală din cele peste 512 bilioane de analogi structurali, teoretic posibili. Stabilitatea structurii acestor peptide este oare o consecință a mecanismului de selecție naturală sau aceasta este o condiție *sine qua non* pentru asigurarea stabilității unor gene structurale? — iată o întrebare care va necesita, probabil, ani îndelungați de cercetare.

Faloidina, component toxic al macromicetei *Amantia phalloides* este o hexapeptidă ciclică, cu o masă moleculară de 770, în compoziția căreia se întîlnesc aminoacizii treonina, cisteina, L-hidroxitriptofan, L-hidroxileucina, alanina și *allo*-hidroxiprolina.

Caracteristică pentru această polipeptidă este prezența legăturii —C—S— care se formează între restul Cys și o grupare hidroxil a L-hidroxitriptofanului, precum și resturile de aminoacizi hidroxilați δ-hidroxileucina și hidroxiprolina. Formula structurală a faloidinei este prezentată în fig. 2.11.

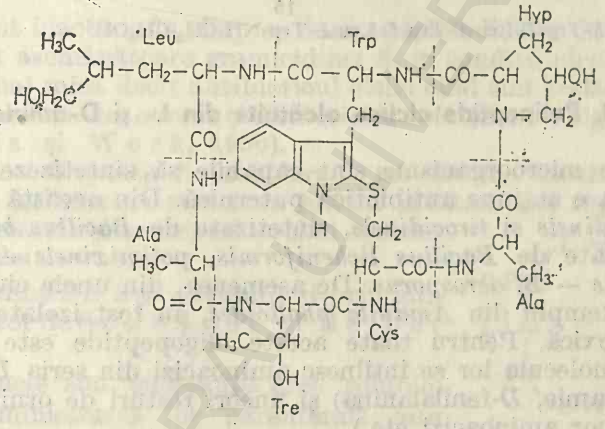


Fig. 2.11. — Faloidina. Restul aminoacidului din partea stîngă este δ-oxileucina

α- și β-amanitinele sînt, probabil, tetrapeptide, deoarece prin hidroliza acidă a acestora se eliberează cisteină, glicină, asparagină și allo-oxiprolină.

2.2.3.3. Polipeptide naturale liniare alcătuite din L- și D-aminoacizi

Poliglutamil-peptidele au fost izolate din membranele celulare de *Bacillus subtilis*, *B. anthracis* și *B. megatherium* și sînt peptide a căror masă moleculară variază de la cîteva mii pînă la 50 000. Aceste polipeptide naturale ale acidului glutamic sînt interesante din punct de vedere biochimic deoarece acidul glutamic are o configurație *D*, predominant

sau exclusiv. În structura acestor peptide se întîlnesc probabil legături α și γ, însă ultimele predomină (fig. 2.12).

Gramicidina A este o polipeptidă liniară, cu o masă moleculară de aproximativ 1 000 daltoni, care are grupa amino formilată la extremitatea N-terminală, iar la extremitatea C-terminală aceiași grupare este blocată de etanolamină (Hunter și Schwartz, 1969).

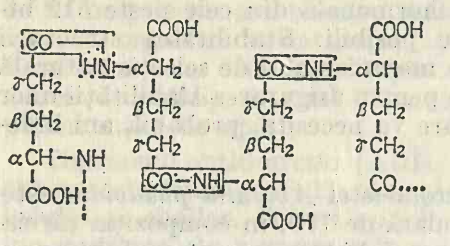


Fig. 2.12. — Structura unui fragment de poliglutamil peptidă

Cross și alții (1949) au arătat că proprietățile bactericide ale gramicidinei *A* în suspensiile de *Staphiloccocus aureus* se datoresc faptului că fosforilarea oxidativă în sistemul cicloforazic este blocată după un mecanism asemănător cu cel descris pentru dinitrofenol. Structura gramicidinei *A* după Hunter și Schwartz este următoarea:

1 5
HCO-NH-L-Val-Gly-*L*-Ala-*D*-Leu-*L*-Ala-*D*-Val-*L*-Val-*D*-Val-*L*-Trp-*D*-
10 15
Leu-*L*-Trp-*D*-Leu-*L*-Trp-*D*-Leu-*L*-Trp-NH-CH_2-CH_2OH

2.2.3.4. Polipeptide ciclice alcătuite din L- și D-aminoacizi

Numeroase microorganisme sînt capabile să sintetizeze oligopeptide ciclice care au o acțiune antibiotică puternică. Din această categorie fac parte *gramicidinele* și *tirocidinele*, sintetizate de *Bacillus brevis*, *bacitracinele* sintetizate de *Bacillus licheniformis*, *polimixinele* — *B. polimixa* și *aerosporinele* — *B. aerosporus*. De asemenea, din unele ciuperci macroscopice, de exemplu din *Amanita phalloides*, au fost izolate ciclopeptide cu acțiune toxică. Pentru toate aceste oligopeptide este caracteristic faptul că în molecula lor se întîlnesc aminoacizi din seria *D* (acizi *D*-aspartic, *D*-glutamic, *D*-fenilalanina) și uneori resturi de ornitină, derivați metalici ai unor aminoacizi etc.).

Gramicidinele sînt ciclopolipeptide cu proprietăți bacteriostatice și bactericide, produse de tulpinile microorganismului *Bacillus brevis*; în funcție de compoziția mediului nutritiv și de condițiile de dezvoltare ale microorganismului tulpinile acestuia sintetizează diferite gramicidine cu acțiune antibiotică deosebită în funcție de numărul și natura resturilor de aminoacizi din care sînt alcătuite.

Cel mai bine studiate au fost gramicidinele *A*, *B*, *S* și *J* (tabelul 2.3). Gramicidina *S* a fost studiată de Gauze și Brajnicowa, (1942).

Gramicidina S este o polipeptidă ciclică deosebit de activă în cazul bacteriilor grampozitive, produsă de *Bacillus brevis* împreună cu alte polipeptide ciclice *gramicidina J*, *gramicidina* Dubeau, *gramicidina A*, *B* și *C* și *gramicidina* C_D. În structura gramicidinelor au fost identificate mai multe resturi de aminoacizi din seria *D*: *D*-Orn; *D*-Leu și *D*-Phe. Pentapeptidele sintetice care au aceiași secvență primară ca jumătate din molecula de gramicidina *S* *L*-Val—*L*-Orn—*L*-Leu—*D*-Phe—

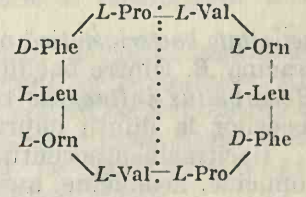
TABELUL 2.3

Compoziția în aminoacizi a gramicidinelor A, B, S, și J

Natura și restul de aminoacid întîlnit	*Numărul resturilor de aminoacizi în gramicidina*			
	A	*B*	*S*	*J*
L-*Aminoacizi*				
L-Valina	1	1	2	1
L-Prolina	1	1	2	1
L-ornitina	1	1	2	1
L-Leucina	1	1	2	—
L-Fenilalanina	1	—	—	1
L-Glutamic(acid)	1	1	—	—
L-Aspartic(acid)	1	1	—	—
L-Triptofan	—	1	—	—
L-Tirozina	1	1	—	—
D-*Aminoacizi*				
D-Fenilalanina	2	2	2	1
D-Leucina	—	—	—	1
D-Ornitina	—	—	—	1

—*L*-Pro— sînt inactive, în timp ce decapeptidele liniare cu structură primară complet asemănătoare gramicidinei *S*, în condiții identice au o activitate mult mai mică decît antibioticul ciclic cînd sînt testate pentru culturile de *Staphiloccocus aureus* și *Escherichia coli*. (Erlanger și alții, 1954; Haris și Work, 1950).

Gramicidina *S* poate fi considerată un dimer, deoarece cele două pentapeptide întîlnite în structura ei sînt identice sub raportul compoziției în aminoacizi și se repetă creind o simetrie a moleculei.

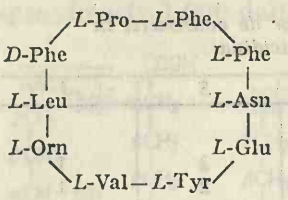


Graminicidina *S* a fost obținută și prin sinteza în laborator de Schwyzer și Seiber în 1957.

Gramicidinele sînt substanțe greu solubile în apă și administrarea lor parenterală este extrem de toxică; se folosesc în tratamentul rănilor externe, în chirurgie, în practica ginecologică, dizenterie etc. Aceste antibiotice prezintă însă și avantaje: sînt substanțe termostabile, care nu sînt distruse nici prin autoclavare la 130°C sau prin încălzire la temperaturi mari în prezența soluțiilor HCl (1 %) sau de H_2SO_4 (25 %). Derivații gramicidinei *S* cu acidul nicotinic, salicilic și p-aminosalicilic, precum și cu alți acizi au activități biologice, sînt netoxici și utilizați în tratamentul tuberculozei.

Tirocidina este o peptidă ciclică cu proprietăți antibiotice și acțiunea ei asupra microorganismelor se concretizează în dezorganizarea membranelor celulare. Pentru manifestarea acțiunii antibiotice este necesară, dar nu absolut obligatorie prezența ciclului și a grupărilor amino libere: tirocidina liniară sintetizată de Ruttenberg, King și Craig (1966) sau decapeptida lui Erlanger și alții (1954) în care gruparea amino a ornitinei este substituită sînt compuși lipsiți de activitate antibiotică. Sub raportul structurii chimice tirocidina se aseamănă cu gramicidina *S*,

dooarece ambele antibiotice conţin cinci aminoacizi aşezaţi într-o secvenţă primară identică — *L*-Val—*L*-Orn—*L*-Leu—*L*-Phe—*L*-Pro—.



Tirocidina este produsă de culturile diferitelor tulpini de *Bacillus brevis* şi în funcţie de compoziţia mediului de cultură şi condiţiile de creştere se pot obţine *tirocidina A*, *B* şi *C*, care se deosebesc după aşezarea şi numărul resturilor de aminoacizi din moleculă, dar au spectru de acţiune similar.

Bacitracinele sînt polipeptide cu proprietăţi antibiotice sintetizate de tulpinile microorganismului *Bacillus licheniformis* şi sînt ciclopeptide care conţin resturi de *D* şi *L*-aminoacizi, au o catenă laterală alcătuită tot din resturi de aminoacizi. Mai bine studiate sînt *bacitracinele A*, *B* şi *C*. Structura bacitracinei *A* este redată în figura 2.13, iar bacitracina *C* se formează în cursul procesului de separare a bacitracinei A. Preparatele de bacitracine sînt amorfe, stabile sub formă de pulbere şi mai puţin stabile în soluţii; în medii acide şi alcaline bacitracinele se inactivează aproape instantaneu (Craig şi alţii, 1952, 1955).

Din punct de vedere al spectrului de acţiune ca antibiotice bacitracinele se apropie de peniciline, însă sînt mai puţin active; cea mai mare

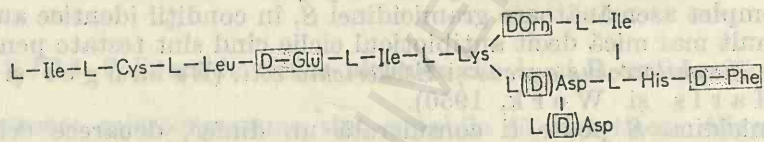


Fig. 2.13. — Structura bacitracinei *A*, izolată din tulpini de *Bacillus licheniformis*.

activitate bacteriostatică o are *bacitracina A* apoi *C* şi în ultimul rînd bacitracina *B*. Dintre bacilii gram-negativi sensibil la bacitracină s-a dovedit *Hemaphilus influenzae* tip *B*; toate bacitracinele inhibă creşterea stafilococilor la diluţii cuprinse între 1 : 40 000—1 : 160 000.

Bacitracinele accentuează acţiunea altor antibiotice — peniciline, streptomicine, neomicine, aureomicine, polimixine şi în practica medicală sînt utilizate pentru tratamentul proceselor inflamatorii localizate.

2.2.3.5. Depsipeptide ciclice

Valinomicina este o depsipeptidă ciclică cu o masă moleculară de aproximativ 1 100 care conţine pe lîngă şase resturi de *L* şi *D*-valină şi cîte trei resturi de acid D-α-hidroxiizovalerianic şi trei resturi de acid *L*-lactic (Brockman şi alţii, 1955; Schemyakin şi colab., 1963). Prin sinteza de laborator au fost obţinuţi numeroşi analogi de sinteză în care numărul şi succesiunea unităţilor componente care se repetă sînt variabile, dar toate preparatele s-au dovedit inactive din punct de vedere al acţiunii bactericide. Pentru asigurarea proprietăţilor antibiotice s-a stabilit că un rol deosebit de important îl au resturile de acid hidroxivalerianic, dimensiunile ciclului şi succesiunea în acesta a resturilor de *D*- şi *L*- izomeri ale aminoacizilor constitutivi (Pressman, 1965; Schemyakin şi colab., 1963 şi alţii).

Acțiunea valinomicinei asupra microorganismelor este condiționată de prezența în mediul de reacție a ionilor de K^+, Cs^+, Rb^+ și fosfat anorganic și este în multe privințe asemănătoare cu cea a gramicidinei.

Valinomicina izolată din culturile de *Streptomycines fulvissimus* conține restul unui singur aminoacid *L* sau *D*-valină, resturi de hidroxiacizi (acid lactic și acid *D*-α-hidroxiizovalerianic) legate între ele prin legături peptidice și esterice (fig. 2.14). Structura valinomicinei a fost confirmată prin sinteza ei de laborator de către S c h e m y a k i n (1963) și acest antibiotic are unele proprietăți neobișnuite, deoarece decuplează fosforilarea oxidativă în mitocondriile izolate, condiționează permeabilitatea selectivă pentru ionii de potasiu a membranelor lipidice artificiale și naturale.

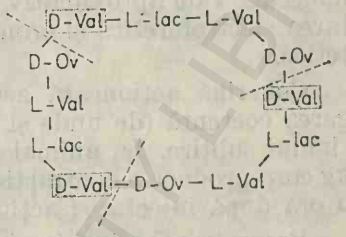


Fig. 2.14. — Structura valinomicinei izolate din *Streptomycines fulvissimus* de către B r o c k m a n și alții (1955), S c h e m y a k i n și c o l a b. (1963). Unitatea structurală alcătuită din resturile de acid *L*-lactic (*L*-lac), *L*-valină, acid *D*-α-hidroxiizovalerianic (*D*-Ov) și *D*-valină este repetată de trei ori consecutiv

Alameticina este un antibiotic activ față de bacteriile gram-pozitive și ineficace față de cele gram-negative, nu este degradabil pe cale enzimatică și a fost izolat din lichidul extracelular al culturilor de *Trichoderma viridae*. Acest antibiotic este alcătuit din 18 resturi de aminoacizi (dintre care șapte resturi de acid α-aminoizobutiric); este o polipeptidă ciclică la formarea căreia participă însă numai 17 din cele 18 resturi de aminoacizi, a cărei structură după P a y n e și H a r t l e y (1970) este reprezentată în figura 2.15.

Alameticina participă activ la transportul cationilor prin membranele microbiene și induce astfel un potențial asimetric al membranei. Este cunoscută și sub numele de *antibiotic U* 22 324.

Enniantinele A și B. Peptide ciclice din clasa hexadepsipeptidelor asemănătoare cu valinomicina, deoarece în structcra lor se întîlnesc trei resturi de acid *D*- și *L*-hidroxiizovalerianic și trei resturi de N-metilizoleucină sau de N-metilvalină. Structurile *enniantinei A* și *enniantinei B* au fost stabilite de P l a t t n e r și a l ț i i (1963) și de Q u i t t și a l ț i i (1963) și confirmată prin sinteza lor în laborator (fig. 2.16).

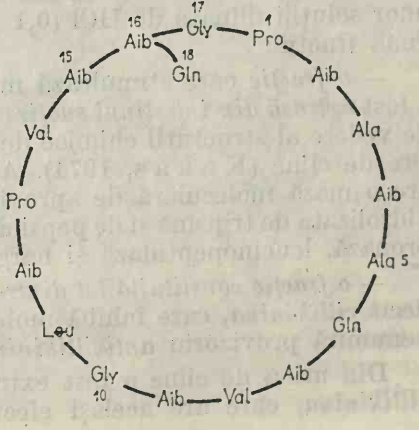


Fig. 2.15. — Structura ciclică a alameticinei izolată din *Trichoderma viridae*. *Aib* — acid α-aminoizobutiric. Ceilalți aminoacizi sînt prescurtați după nomenclatura *IUB*

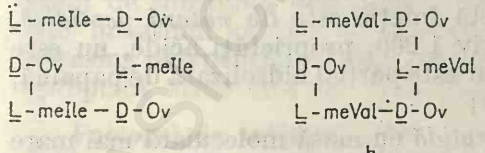


Fig. 2.16. — Structura polipeptidelor ciclice enniantina *A* (a) și enniantina *B* (b) izolate din *Fusarium oxysporum* de către S c h l e c h t, (1947)

6—c. 636 72

Aceste peptide au fost izolate în 1947 de către Schlecht din *Fusarium oxysporum* și din diferite tulpini de *Fusarium*.

2.2.3.6. Alte polipeptide cu activitate biologică

Coherina a fost izolată din neurohipofiză, fiind o polipeptidă cu o masă moleculară de aproximativ 4 000 și care diferă structural și prin comportarea electroforetică și cromatografică de ocitocina și arg-vasopresina sintetice.

Coherina acționează asupra intestinului subțire determinînd propagarea coerentă (de unde și denumirea ei) a contracției de-a lungul intestinului subțire. La animalele de laborator injectarea unei doze de 1 μg/kg corp produce o contracție ritmică, prelungită și coerentă la aproximativ o oră după injectare; acțiunea ei dispare după aproximativ cinci ore.

Prezența coherinei în sînge nu a putut fi evidențiată. Relativ la compoziția ei în aminoacizi se cunoaște faptul că este alcătuită din 32 resturi de aminoacizi (Grossman, 1974) și nu conține metionină, valină, arginină și histidină; un rest de cisteină a fost identificat, fără a se pune în evidență existența unei punți disulfurice. Preparatele pure de coherină au acțiuni ocitocin- și vasopresin- asemănătoare extrem de slabe.

Urogastrona este o peptidă cu masa moleculară de 6 000 daltoni alcătuită din 52 resturi de aminoacizi și avînd trei punți disulfurice. A fost izolată din urina umană și din urina unor animale — cîine, cal, bou, într-o cantitate relativ infirmă — 1 mg la 1 000 litri urină.

Urogastrona inhibă secreția gastrică acidă în doze care pot varia între 0,25—0,50 μg/kg. Efectul ei asupra secreției acide gastrice este relativ lent, declanșîndu-se la aproximativ 30 minute după administrare și încetînd complet după 70—90 minute.

Locul biosintezei și eliberării secreției urogastronei rămîne necunoscut, ca de altfel și rolul ei fiziologic. Gerring și Gregory (1974) menționează, după datele existente în literatură, prezența urogastronei și în glanda hipofiză, splină, duoden și pancreas.

Villikinina a fost extrasă din mucoasa intestinului subțire cu ajutorul unor soluții diluate de HCl (0,1 *N*) și s-a dovedit că este alcătuită din două fracții:

— *o fracție* care stimulează mobilitatea vilozităților intestinale, care a fost *extrasă din intestinul subțire* de porc, bou și de om, diferită din punct de vedere al structurii chimice de cea similară, izolată din intestinul subțire de cîine (Kokas, 1974). Această fracție este de *natură peptidică*, are o masă moleculară de aproximativ 1 200, proprietăți acide, nu este hidrolizată de tripsină și de pepsină, dar este parțial hidrolizată de papaină, pronază, leucinopeptidază și nargază;

— *o fracție constituită tot dintr-o peptidă* cu masă moleculară mai mare decît *villikinina*, care inhibă mobilitatea vilozităților intestinale și a fost denumită provizoriu *antivillikinina* (Kokas, Johnson, 1965).

Din urina de cîine a fost extrasă o a treia substanță denumită *urovillikinina*, care are același efect asupra vilozităților intestinale ca și

villikinina. Urovillokinina a fost ulterior identificată și la om după introducerea în duoden a unor soluții diluate de HCl (0,1 *N*) și după inegerarea alimentelor (K o k a s, 1974).

Rolul villokininei în procesul digestiei și absorbției este încă insuficient precizat. K o k a s emite ipoteza că villikilina acționînd asupra vilozităților intestinale îndeplinește rolul unui mixer al chimului, asigurînd condițiile corespunzătoare pentru absorbție.

Numeroși cercetători consideră că denumirea de hormoni de natură peptidică poate fi atribuită și altor substanțe secretate și eliberate la nivelul tubului digestiv. Multe din aceste substanțe nu au fost studiate din punct de vedere chimic și testarea acțiunii lor fiziologice este de dată recentă.

A n d e r s o n (1974) precizează că — extractul de duoden de porc este capabil să inhibe secreția acidă a stomacului de cîine, iar dacă zona bulbară a duodenului este acidulată se constată o inhibiție aproape completă a secreției gastrice acide, determinată de gastrina exogenă. A n d e r s o n presupune că această acțiune s-ar datora unei substanțe de natură polipeptidică cu caracter acid, diferită ca structură de secretină și de colecistokinină și propune să fie denumită *bulbogastronă*.

N a s s e t (1974) descrie, de asemenea, izolarea unei peptide din intestinul subțire capabilă să stimuleze secreția celulelor mucoasei intestinului subțire. Polipeptida se numește *enterocrinina* și nu a putut fi identificată și în alte organe.

Enteroglucan. Alte substanțe de natură polipeptidică au fost izolate de S a s a k i, F o l o o n a și U n g e r (1974) din pancreas și denumite *enteroglucan*. Autorii citați separă din pancreas două fracții proteice care se deosebesc după masa moleculară: fracția I cu o masă moleculară de 3 500, și este constituită dintr-o peptidă cu o structură primară asemănătoare cu glucagonul, are o acțiune glicogenolitică în ficatul perfuzat; fracția a II-a, este constituită dintr-o polipeptidă cu o masă moleculară de două ori mai mare (aproximativ 7 000 daltoni) inactivă fiziologic, care probabil este un precursor al enteroglucagonului. Și în cazul acestor două polipeptide sînt necesare încă cercetări privind rolul fiziologic și mecanismele de secreție și de eliberare.

Incretina. Numeroasele semnalări că glucoza introdusă „per os" determină o creștere a concentrației insulinei în sîngele periferic mai mare decît dacă se administrează intravenos au dus la concluzia că insulina este eliberată sub acțiunea hormonilor tractului gastro-intestinal — gastrina, secretina, GIP și VIP, iar rolul de factor de eliberare a insulinei este îndeplinit de substanța denumită *incretina* secretată de mucoasa intestinală. Din intestinul subțire de porc s-a izolat o peptidă denumită „insulin releasing polypeptide" (IRP) care se presupune că ar fi identică sau foarte apropiată structural de GIP (C r e u t z f e l d t, 1974).

Factorul de sulfatare. Prin denaturarea proteinelor plasmatice, prin fierberea sau în cursul extracției cu alcool etilic, a fost separat un factor, cu masă moleculară mică, de aproximativ 8 000 și de natură polipeptidică, care circulă în plasmă asociat cu componenți cu mase moleculare mai mari. Acest factor denumit *factor de sulfatare* s-a dovedit a avea acțiuni

multiple: stimulează incorporarea sulfatului în *condroitinsulfatul* din cartilagii, a prolinei și hidroxiprolinei în *colagen* și are o acțiune insulin-asemănătoare stimulînd transformarea glucozei-^{14}C în $^{14}CO_2$ în adipocitele de șobolan. De asemenea, factorul de sulfatare stimulează incorporarea timidinei în cartilagiile coastelor de șobolan și în DNA, iar *acțiunea hormonului de creștere pare a fi mediată tot de el.*

Denumită *factor de sulfatare* sau *factor timidinic* noua substanță a fost recent considerată de Daughadai, Hall, Raben, Salmon, Brande și Wyk (1972) ca o *somatomedină* (prefixul *somato* relevă interrelațiile ei cu soma și somatotropina și *median*, care arată că mediază acțiunea STH).

* * *

Elucidarea structurii peptidelor și polipeptidelor a confirmat faptul că resturile aminoacizilor din care acestea sînt alcătuite sînt unite între ele prin *legături de natură covalentă* denumite *legături peptidice. Natura resturilor de aminoacizi și, îndeosebi, ordinea în care acestea se succed în structura peptidelor și polipeptidelor se găsesc în strînsă concordanță cu proprietățile fizico-chimice ale moleculelor și cu activitatea lor biologică.*

Peptidele și polipeptidele sînt *substanțe larg răspîndite în lumea vie și îndeplinesc în organisme roluri diverse: substanțe structurale* (anserina și carnozina), *transportori de electroni* (glutationul), *factori de reglare a activității unor glande cu secreție internă* (factorii de eliberare secretați de hipotalamus: CRF, TRF, MSH-RF, FSH-R-IF etc.), *factor de sulfatare, hormoni* (hormonul adrenocorticotrop, hormonul α- și β-melanocitostimulator, glucagonul, secretina, bradikinina, eledoisina, gastrina ș.a.m.d.), *antibiotice* (gramicidinele, tirocidinele, penicilinele și altele), *substanțe toxice* (faloidina, α- și β-amanitina etc.). Numeroase peptide și polipeptide naturale sînt *utilizate în terapeutica medicală a maladiilor umane* sub formă de *preparate farmaceutice*, în laboratoarele de biochimie în calitate de *reactivi chimici*, iar *determinarea lor cantitativă în diferite lichide și umori biologice* este practicată în *scopul stabilirii mai exacte a diagnosticului.*

Cunoașterea structurii biochimice a peptidelor și polipeptidelor naturale a permis elaborarea unor procedee și metode corespunzătoare pentru obținerea lor prin sinteza în laborator și/sau pe scară industrială. *Sinteza de polipeptide naturale în instalații automate* (ocitocina, vasopresina, bradikinina, catenele *A* și *B* ale insulinei ș.a.) a deschis calea preparării prin sinteză a analogilor structurali ai peptidelor naturale cu acțiune farmacologică și farmacodinamică. Microorganismele care sintetizează polipeptide cu proprietăți antibiotice sînt utilizate în industria medicamentelor pentru prepararea pe cale industrială a antibioticelor.

Studiul polipeptidelor a prezentat un viu interes pentru stabilirea compoziției chimice și a structurii macromoleculelor proteice.

3

PROTEINE. CLASIFICARE. CONFORMAȚIE MOLECULARĂ, METODE DE ANALIZĂ

Proteinele sînt substanțe organice macromoleculare prezente în celulele microorganismelor, plantelor și animalelor unde alcătuiesc peste 50% din greutatea uscată a acestora. Proteinele îndeplinesc în celulele vii diferite *roluri*: *plastic* sau *structural*, reprezentînd constituenții principali ai citoplasmei și infrastructurilor celulare, a umorilor și fluidelor organismelor vii; *catalitic*, mediază accelerînd selectiv reacțiile biochimice specifice vieții în calitate de enzime; *energetic*, furnizînd energia necesară menținerii funcțiilor normale în cazuri limită pentru celulă sau pentru organism (inaniție, subalimentație, procese inflamatorii și patologice etc.), de *transport*, *hormonal*, *imunologic* ș.a. Proteinele constituie, de asemenea, *instrumentul molecular al expresiei informației genetice conținute în acidul deoxiribonucleic din cromozomi*.

Proteinele sînt componentele structurale și funcționale legate intim de procesele vieții, care nu pot fi concepute în lipsa substanțelor proteice și denumirea lor vine de la cuvîntul grecesc *protos*. În funcție de însușirile lor, de rolul pe care-l îndeplinesc sau de structura lor chimică proteinele pot fi clasificate în diverse moduri, o clasificare riguros științifică dovedindu-se o acțiune dificilă. În tabelele 3.1 și 3.2 sînt redate două clasificări ale proteinelor în funcție de două criterii distincte.

La fel de dificilă este și delimitarea strictă a proteinelor de polipeptide. Numeroși autori înclină să delimiteze aceste două categorii de biopolimeri după masa moleculară: pînă la 10 000 de daltoni — polipeptide, peste 10 000 de daltoni — proteine, dar această categorisire își pierde importanța și utilitatea dacă cele două feluri de biopolimeri sînt analizate și comparate pe baza altor criterii, de exemplu, după proprietățile fizico-chimice, după funcțiile biologice pe care le pot îndeplini sau după forma moleculelor lor.

TABELUL 3.1

Clasificarea proteinelor după funcția biologică pe care o îndeplinesc

Tipul de proteine *(a)*	Răspîndire și funcția îndeplinită *(b)*
Proteine structurale	
Colagen	Țesut conjunctiv (cartilagii, tendoane, piele, oase etc.)
Elastina	Țesut conjunctiv elastic (ligamente)
Fibroina	Mătasea coconilor de *Bombix mori*
Sclerotina	Exoscheletul insectelor
α-keratina	Dermă, formațiuni cornoase (păr, penaj, fanere etc.)
Proteinele membranare structurale	Componente ale membranelor
Proteine de rezervă	
Cazeina	Componenta principală a laptelui
Gliadina	Cariopsele cerealelor
Zeina	Proteina de rezervă din boabele de porumb
Ovalbumina, lactalbumina	Proteine de rezervă din ouă și respectiv din lapte
Feritina	Proteina care facilitează depunerea Fe în splină
Proteine contractile	
Actina	Faza de repaus a miofibrilelor
Miozina	Mișcarea filamentelor în miofibrile
Dineina	Mișcarea cililor și flagelilor la nevertebrate
Proteine de transport	
Hemoglobina	Transportă oxigenul în sîngele vertebratelor
Mioglobina	Transportă oxigenul la nivelul mușchilor
Albuminele serice	Transportă acizii grași în sînge
β-Lipoproteinele	Transportă lipidele sanguine
Proteine cu acțiune hormonală și catalitică (enzime)	
Hormonii lobului anterior al hipofizei	Reglează în „cascadă" activitatea glandelor endocrine, biosinteza și eliberarea de hormoni în sînge
Enzimele din clasa hidrolazelor (pepsina, tripsina, chimotripsina, carboxipeptidaza *A* și *B* ș.a.)	Hidrolizează proteinele și catenele polipeptidice cu formare de peptide, peptone și aminoacizi
Citocromii *c*	Participă la transferul de electroni
Proteine de protecție	
Trombina	Participă la mecanismul coagulării sîngelui
Fibrinogenul	Precursor al fibrinei care participă la coagularea sîngelui
Anticorpii (imunoglobuline)	Formează complexe anticorp-antigen cu proteinele străine organismului respectiv

Numeroase proteine au fost izolate în stare pură și obținute sub formă cristalină, și *analiza lor elementară* a demonstrat că ele conțin *carbon*, *hidrogen*, *oxigen*, *azot* și, uneori, *sulf* și *fosfor*. Unele proteine conțin în molecula lor și alte elemente chimice: *fier*, *zinc*, *cupru*, *molibden*, *mangan*, *magneziu* ș.a. Prin hidroliză proteinele pun în libertate numeroși compuși organici

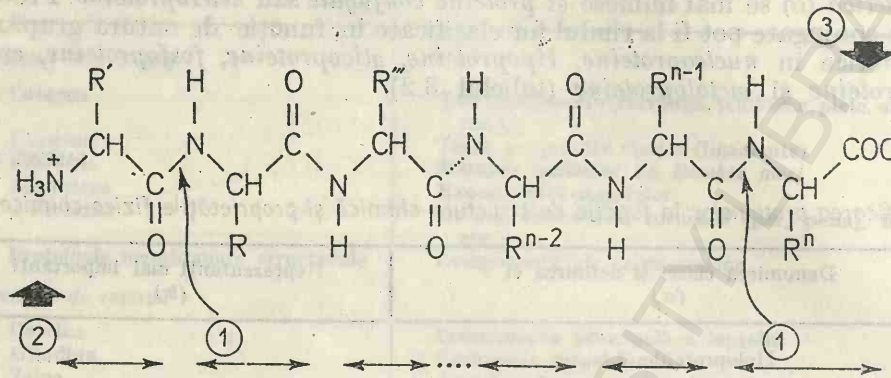
simpli — aminoacizi și în unele cazuri și alte substanțe organice cu masă moleculară relativ mică sau substanțe anorganice. *Proteinele simple* sau *holoproteine*, sînt proteinele alcătuite din aminoacizi, iar proteinele alcătuite din aminoacizi și alte substanțe organice, denumite *grupare*(i) *prostetică* (e) se mai numesc și *proteine conjugate* sau *heteroproteine*. Proteinele conjugate pot fi la rîndul lor clasificate în funcție de natura grupării prostetice în *nucleoproteine*, *lipoproteine*, *glicoproteine*, *fosfoproteine*, *cromoproteine* și *metaloproteine* (tabelul 3.2).

TABELUL 3.2

Clasificarea proteinelor în funcție de structura chimică și proprietățile fizico-chimice

Denumirea clasei și definirea ei *(a)*	Reprezentanți mai importanți *(b)*
Holoproteide	
proteine care prin hidroliză pun în libertate numai aminoacizi	
— de formă sferică sau elipsoidală, *proteine globulare*, solubile în apă și în soluții saline diluate	Albumine, α-, β- și γ-globulinele, anticorpii, histone, protamine
— de formă alungită, în unele cazuri pînă la apariția de fibre — *proteine fibrilare*. În funcție de solubilitatea lor în soluții saline concentrate se împart în :	
— proteine solubile	Fibrinogenul, miozina, actina
— proteine insolubile	Colagenul, α- și β-keratina, fibroina.
Heteroproteide	
proteine complexe care prin hidroliză pun în libertate aminoacizi și o componentă prostetică de natură organică. Forma moleculelor și proprietățile fizico-chimice variază în funcție de complexitatea structurală	
— *Cromoproteide*, componentă prostetică de natură protoporfirinică	Hemoglobina, mioglobina, citocromii *c*, catalaza, peroxidaza.
— *Lipoproteide*, componentă prostetică de natură lipidică (fosfolipide, colesterol, lipide neutre)	β_1-Lipoproteide
— *Nucleoproteide*, componenta prostetică o constituie acizii nucleici	Deoxiribonucleoproteide și ribonucleoproteine
— *Fosfoproteide*, componenta prostetică o constituie resturile de serină esterificate cu acid ortofosforic	Cazeina, vitelina, vitelenina, fosvitina
— *Glicoproteide*, componenta prostetică este de natură zaharidică : galactoza, hexozamina, manoza, acidul N-acetilneuraminic ș.a.	γ-Globulina, orosomucoidul plasmatic, ovalbumina, α_1-, α_2- și β-glucoproteinele plasmei umane, glucoproteinele membranei bacteriene, mucinele ș.a.
— *Flavoproteide*, componenta prostetică este un flavin nucleotid	Unele enzime : *D*-aminoacid oxidaza, succinat dehidrogenaza ș.a.
— *Metaloproteide*, componenta prostetică este un metal (Fe, Zn, Cu etc.)	Alcool dehidrogenaza, enolaza, amilaze bacteriene, tirozin oxidaza, feritina, citocrom oxidaza, conalbumina, cerebrocupreina

În molecula proteinelor resturile de aminoacizi sînt unite între ele prin *legături peptidice*, ca și în cazul peptidelor, dînd naștere unui polimer liniar. În principiu, formula structurală a unui fragment din catena polipeptidică a unei proteine poate fi reprezentată astfel:



unde: *1* este legătura peptidică; *2* — extremitatea N-terminală a catenei polipeptidice; *3* — extremitatea C-terminală a catenei polipeptidice și ↔resturile aminoacizilor care alcătuiesc catena polipeptidică. Numărul resturilor de aminoacizi dintr-o proteină poate fi de ordinul sutelor și poate ajunge pînă la cîteva mii, după cum o moleculă proteică poate fi alcătuită *dintr-o singură catenă polipeptidică* sau din *mai multe catene polipeptidice*. În tabelul 3.3 se redă comparativ numărul resturilor de aminoacizi, masa

TABELUL 3.3

Structura comparativă a unor molecule proteice izolate din diverse surse biologice

Denumirea proteinei	*Sursa din care a fost izolată*	*Numărul resturilor de aminoacizi din moleculă*	*Masa moleculară*	*Numărul catenelor polipeptidice*
Hemoglobină	Sînge uman	574	64 500	4
Serumalbumină	Sînge uman	550	68 500	1
Insulină	Pancreas de bovine	51	5 770	2
Chimotripsină	Pancreas de bovine	241	22 600	3
γ-Globulină	Sînge de cal	1 250	149 000	4
Glutamat dehidrogenaza	Ficat de bovine	8 300	1 000 000	40
Proteina virusului mozaicului tutunului	Virusul mozaicului tutunului (VMT)	336 500	40 000 000	2 130

moleculară și numărul catenelor polipeptidice din cîteva proteine izolate din diverse surse biologice.

Pentru a stabili ordinea în care se succed resturile de aminoacizi în catena polipeptidică, care alcătuiește proteina, sau în catenele polipeptidice întîlnite în structura proteinelor cu masă moleculară mare este absolut necesar să se lucreze pe *preparate pure de proteine*, izolate în condiții experimentale corespunzătoare, care să nu determine o alterare a structurii lor chimice și caracterizate din punct de vedere fizico-chimic.

3.1. SEPARAREA, PURIFICAREA ȘI CARACTERIZAREA FIZICO-CHIMICĂ A PROTEINELOR

3.1.1 Separarea și purificarea proteinelor

Separarea și purificarea proteinelor este indispensabilă studierii structurii și proprietăților lor, întîmpină de cele mai multe ori dificultăți considerabile mai ales datorită faptului că majoritatea proteinelor reprezintă combinații macromoleculare de cele mai multe ori cu o *structură foarte labilă*, care în cursul izolării și purificării poate fi modificată mai mult sau mai puțin profund. *Aceste modificări pot altera structura proteinei* și pot conduce, de asemenea, la *pierderea proprietăților biologice* sau la modificarea unor parametri fizico-chimici.

Pe de altă parte solubilitatea proteinelor ridică probleme în alegerea procedeului de purificare, în sensul că proteinele insolubile spre exemplu, deși pot fi ușor separate de componentele lipidice, glucidice sau de proteinele solubile, de regulă sînt separate foarte greu unele de altele. Acest lucru se datorește în principal, faptului că *metodele de purificare se bazează*, de regulă, *pe procese ce se petrec în soluție*. La rîndul lor proteinele solubile reprezintă de cele mai multe ori amestecuri complexe de proteine a căror separare este uneori laborioasă și în unele cazuri imposibilă, prin procedee obișnuite.

În general *extracția proteinelor solubile din materialele biologice se realizează cu soluții saline* sau mai rar *cu soluții diluate de glicerină sau de acetonă*. Din soluțiile astfel obținute proteinele pot fi separate de celelalte componente prin *dializă*, utilizîndu-se membrane semipermeabile de colodiu (fig. 3.1). Dacă pentru accelerarea îndepărtării ionilor străini se face apel și la un proces de *electroliză*, operațiunea poartă numele de *electrodializă*. La sfîrșitul operațiunii de dializă proteinele insolubile în apă distilată precipită. Soluția proteinelor separate prin dializă este prelucrată în continuare în vederea *purificării proteinelor*, cel mai adesea pe una din următoarele căi :

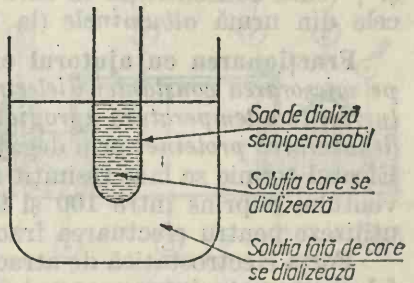


Fig. 3.1. — Dializa soluțiilor proteice prin membrane semipermeabile

Fracționare cu ajutorul sărurilor. *Metoda constă într-o precipitare fracționată a proteinelor, adăugînd treptat la extractul proteic total sau în soluțiile obținute după dializă, cantități din ce în ce mai mari de săruri neutre* (de obicei sulfat de amoniu, sulfat de sodiu, amestecuri de fosfați primari și secundari de potasiu, dar uneori și citrat sau fosfat de amoniu), fie sub formă de cristale, fie sub formă de soluții saturate. Sarea se adaugă în porțiuni mici și după fiecare adaos precipitatul obținut se separă prin centrifugare. În concentrații mari sărurile neutre scad solubilitatea proteinelor determinînd precipitarea lor. Întrucît

fiecare proteină precipită la o anumită concentraţie a unei sări neutre, teoretic este posibilă precipitarea fracţionată treptată a proteinelor prezente într-un extract tisular sau/şi celular sau dintr-un amestec. Între solubilitatea S şi tăria ionică μ a unei sări neutre există relaţia matematică

$$\lg S = \beta - K_S \cdot \mu,$$

unde β este constanta de intersectare a dreptei care exprimă grafic relaţia matematică cu axa ordonată pe care se înscrie $\lg S$; K_S — este constanţa de precipitare caracteristică pentru o proteină cu o stare neutră dată, iar μ — tăria ionică a soluţiei dată de raportul

$$\mu = 1/2 \Sigma C_i Z_i^2$$

în care: C_i este concentraţia în moli/1 000 g de apă şi Z_i — valenţa în funcţie de pH soluţiei.

Precipitarea fracţionată a proteinelor cu ajutorul sărurilor neutre se bazează pe faptul că la concentraţii mari ionii sării prin numărul şi afinitatea lor pentru apă îndepărtează o mare parte a moleculelor de apă care în mod obişnuit hidratează suprafaţa proteinelor, determinînd astfel precipitarea lor din soluţie. Precipitarea proteinelor este un fenomen reversibil: introducerea în sistem a unei cantităţi suficiente de apă provoacă dizolvarea precipitatului ceea ce denotă că structura terţiară a proteinelor nu a fost modificată. Procedeul este folosit şi la scară industrială pentru prepararea unor proteine biologic active.

Metoda se dovedeşte foarte eficace în cazul separării proteinelor din serul sanguin, din extractele proteice totale obţinute din diferite ţesuturi etc. Astfel, prin modificarea concentraţiei de sulfat de amoniu a unei soluţii de proteine provenite din serul sanguin precipită întîi *fibrinogenul*, apoi *globulinele* care la rîndul lor pot fi separate în trei fracţiuni α, β şi γ (cînd concentraţia în sare ajunge la 1,34, 1,64 şi 2,05 mol/l), iar în cele din urmă *albuminele* (la 2,57 mol/l).

Fracţionarea cu ajutorul etanolului sau acetonei. *Metoda se bazează pe micşorarea constantei dielectrice a soluţiilor proteice şi este necesar să se lucreze la o temperatură apropiată celei de congelare a soluţiei, spre a se evita denaturarea proteinei* prin degajarea de căldură datorită diluării alcoolului. Efectul termic se face resimţit mai ales în intervalul de concentraţii a solventului cuprins între 100 şi 90%, şi de aceea, este recomandabil să se utilizeze pentru efectuarea fracţionării etanol 90% puternic răcit.

Forţa electrostatică de atracţie dintre două molecule proteice de acelaşi fel şi prezente într-un amestec apos este exprimată de ecuaţia:

$$E = Q_1 \cdot Q_2 / D \cdot r^2,$$

unde Q_1 şi Q_2 sînt sarcinile electrice de sens contrar; D — constanta dielectrică a mediului şi r — distanţa dintre cele două molecule proteice. Apa are o constantă dielectrică mare (aproximativ 80) şi ca urmare soluţiile apoase micşorează forţa de atracţie dintre sarcinile electrice de semn contrar ale moleculelor proteice şi acestea se menţin în soluţie, deci solvite. Adăugarea de solvenţi organici, care, de regulă, au constante die-

lectrice mult mai mici decît apa (eter 4,1; alcool etilic — 25; alcool metilic — 32) scad constanta dielectrică a mediului determinînd o creştere a atracţiei dintre moleculele proteice şi a tendinţei lor de a se uni, dînd naştere unui precipitat.

Solvenţii organici intervin şi direct influenţînd procesul de solubilizare a proteinelor datorită faptului că intră în competiţie cu moleculele proteinelor pentru moleculele de apă şi astfel provoacă o deshidratare a proteinelor însoţită de precipitarea lor.

Utilizarea solvenţilor organici pentru precipitarea proteinelor se face în funcţie de acţiunea lor denaturantă asupra proteinelor, de solubilitatea în apă şi de măsura în care ei determină o scădere a constantei dielectrice a mediului de reacţie.

Electroforeza. Proteinele conţin în molecula lor sarcini electropozitive şi electronegative datorită prezenţei grupărilor ionizabile ale aminoacizilor constituenţi. În mediu alcalin proteinele au tendinţa de a fi încărcate electronegativ datorită reacţiei:

$$R-COOH \overset{OH^-}{\rightleftharpoons} RCOO^- + H_2O,$$

iar în mediu acid au sarcini net electropozitive datorită reacţiei:

$$R-NH_2 \overset{H_3O^+}{\rightleftharpoons} R-NH_3^+ + H_2O$$

Pe baza acestei comportări, dacă un *amestec de proteine este plasat într-un cîmp electric proteinele cu sarcină negativă migrează spre anod, cele cu sarcină pozitivă spre catod, iar cele pentru care pH soluţiei reprezintă tocmai pH izoelectric vor rămîne pe linia de start* (fig. 3.2). Viteza cu care are loc migrarea unei proteine depinde de raportul dintre sarcinile electronegative şi electropozitive din macromoleculă, precum şi de forma şi dimensiunile moleculei şi este aşadar o proprietate caracteristică a unei proteine la un *pH* dat. Pe baza acestei proprietăţi electroforeza este o metodă utilizată frecvent pentru separarea proteinelor.

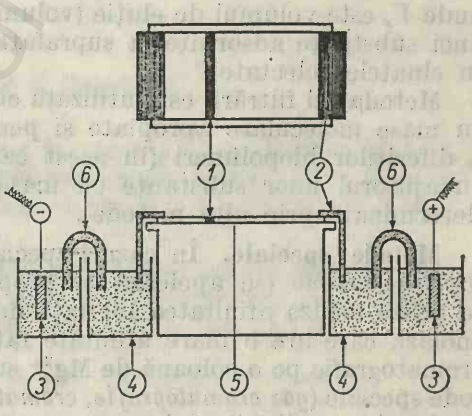


Fig. 3.2. — Schema unui aparat de electroforeză zonală:

1 — locul aplicării probelor sau linia de start; *2* şi *6* — punţi de legătură între suportul solid şi soluţia tampon folosită pentru electroforeză sau între vasele cu soluţii tampon; *3* — electrozi; *4* — vase cu soluţii tampon; *5* — suportul solid folosit pentru electroforeză (hîrtie, geluri de amidon, agar-agar, poliacrilamidă).

Cromatografia cu ajutorul schimbătorilor de ioni. *Metoda se bazează pe utilizarea unor coloane cromatografice umplute fie cu dietilaminoetilceluloză cu caracter slab bazic, fie cu carboximetilceluloză cu caracter slab acid.* Dacă spre exemplu soluţia unor proteine este trecută printr-o coloană cu dietilaminoetilceluloză, unele proteine sînt legate şi pot fi ulterior eluate succesiv din coloană prin creşterea concentraţiei eluentului în săruri. Se realizează astfel o bună separare a proteinelor din amestecul lor.

Adsorbția pe geluri. *Anumite proteine pot fi absorbite de geluri de fosfat de calciu sau hidroxid de aluminiu cu o eficacitate cu atît mai mare cu cît pH este mai scăzut și tăria ionică mai mică.* Eluarea proteinei are loc pe măsură ce crește *p*H sau tăria ionică. Adsorbția pe geluri este adesea utilizată și în scopul concentrării soluțiilor diluate (de exemplu, absorbția pe geluri de Sephadex G-25).

Filtrare pe geluri. *Metoda utilizează geluri speciale, care funcționează ca site moleculare* separînd proteinele pe baza dimensiunilor lor.

Teoria gel filtrării a fost introdusă și dezvoltată de Flodin și Porath (1959) și volumul total al coloanei de gel este egal cu

$$V_t = V_0 + V_i + V_g,$$

unde V_0 este volumul spațiului gol reprezentat de volumul apei care se află în afara particulelor de gel; V_i — volumul spațiului din interiorul particulelor de gel, plin cu apă; V_g — volumul ocupat de particulele gelului.

Repartiția unei substanțe date între apa din volumul spațiului gol și apa din volumul spațiului interior este dată de un coeficient de distribuție K_d. Valoarea K_d este dată de porozitatea particulelor de gel, o substanță care are $K_d = 0$ este complet exclusă din lichidul ce se află în interiorul particulelor de gel. Cînd K_d unei substanțe este cuprins între 0 și 1 aceasta este numai parțial exclusă din interiorul particulelor de gel.

Comportarea oricărei substanțe pe o sită moleculară poate fi riguros exprimată prin ecuația:

$$V_e = V_0 + K_d - V_i,$$

unde V_e este volumul de eluție (volumul de selecție utilizat pentru eluarea unei substanțe adsorbite la suprafața coloanei de gel pînă la apariția ei în eluatele colectate).

Metoda gel filtrării este utilizată cu succes pentru separarea proteinelor cu mase moleculare apropiate și pentru determinarea masei moleculare a diferiților biopolimeri (în acest caz este necesară etalonarea coloanei cu ajutorul unor substanțe cu masă moleculară cunoscută și eventual determinată prin alte metode).

Metode speciale. În cazuri speciale, de exemplu, al *purificării unor proteine-enzime* (se apelează la proprietățile părții proteice a enzimei) se poate utiliza afinitatea lor față de diverși ioni metalici. De exemplu, enolaza care are o mare afinitate față de ionii Mg^{2+} poate fi purificată cromatografic pe o coloană de Mg^{2+} sulfoximetilceluloză sau prin alte metode speciale (*gaz cromatografie, cromatografie de afinitate, metoda focalizării izoelectrice, a distribuției contracurent etc.*).

3.1.2 Verificarea purității proteinelor

Analiza purității proteinelor izolate și purificate prin una din metodele descrise mai sus se poate realiza doar pe baza unor criterii diferite de analiză, cunoscînd faptul că obținerea proteinelor sub formă cristalină nu întotdeauna poate constitui un criteriu al purității proteinelor.

În afară de posibilitatea verificării purității unei proteine prin utilizarea *electroforezei*, a *cromatografiei pe schimbători de ioni* (metode utilizabile atît pentru separare cît și pentru verificarea purității) și a *ultracentrifugării* (descrisă în continuare printre metodele de stabilire a masei moleculare), un important criteriu al purității unei proteine îl constituie *solubilitatea*. Curba de solubilitate a unei proteine furnizează date în ceea ce privește puritatea ei, deoarece în solvirea unei substanțe pure cantitatea solvită este în permanență egală cu cantitatea adăugată solventului, pînă la atingerea concentrației de saturație. După saturarea solventului, la o temperatură dată, proteina nu se va mai putea solvi și curba de solubilitate va avea forma *1* din figura 3.3. Dacă însă e vorba de un amestec de două proteine, proteina mai solubilă va continua să se solve și după ce prima a atins nivelul de saturație, astfel că forma curbei de solubilitate a amestecului de proteine va fi cea a curbei *2*. Așadar, apariția a două sau mai multe puncte de discontinuitate în curba de solubilitate trădează existența unui amestec de proteine și nu a unei proteine pure.

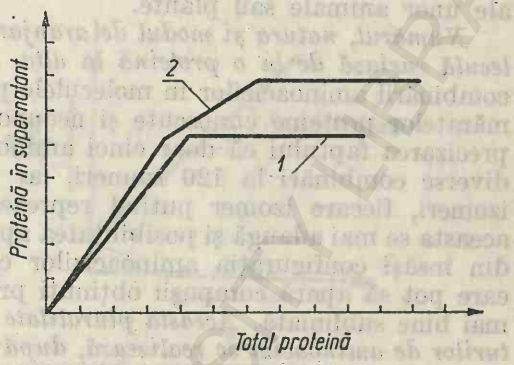


Fig. 3.3. — Curbele de solubilitate a unei *1*— proteine purificate și *2*—a unui amestec de proteine

3.1.3 Compoziție și structură

Elementele chimice care se întîlnesc în structura proteinelor sînt C, H, O, N și uneori S și P. În structura proteinelor complexe și a unor enzime s-au găsit și alte elemente chimice: Mo, Mn, Mg, Ca, Zn, Cu, Co și altele.

Compoziția elementară a proteinelor furnizează puține date pentru elucidarea constituției lor, ea variind în limite relativ restrînse pentru imensa varietate a proteinelor animale, vegetale și microbiene:

$$C = 50 - 54\%;\ H = 6{,}5 - 7{,}5\%;\ O = 20 - 25\%;\ N = 15 - 18\%;$$

$$S = 0{,}3 - 2{,}5\%.$$

Pentru proteine cea mai caracteristică dintre aceste date este valoarea procentuală medie a azotului, care la majoritatea proteinelor este de 16—17.

Deoarece *unitatea structurală a proteinelor* este *molecula* de *aminoacid*, problema de bază a structurii proteinelor rezidă desigur, pe de o parte, *în identificarea aminoacizilor care alcătuiesc proteinele*, iar pe de altă parte, *modul în care resturile moleculelor de aminoacizi sînt legate între ele* spre a forma edificiile macromoleculare ale proteinelor.

Hidroliza totală a proteinelor a pus în evidență faptul că numai *aproximativ 20 de aminoacizi* diferiți apar frecvent în molecula proteinelor. Alți *30 — 40 aminoacizi*, denumiți și *aminoacizi ocazionali* participă rar sau foarte rar la structura proteinelor sau se găsesc numai în unele proteine izolate din lichide sau din țesuturi și organe speciale ale unor animale sau plante.

Numărul, natura și modul de aranjare a resturilor aminoacizilor în moleculă variază de la o proteină la alta. Posibilitățile infinit de multe ale combinării aminoacizilor în moleculele proteinelor explică existența nenumăratelor proteine cunoscute și necunoscute din natură. Este suficientă precizarea faptului că doar cinci aminoacizi pot da naștere teoretic prin diverse combinări la 120 izomeri, iar 10 aminoacizi la peste 3 600 000 izomeri, fiecare izomer putînd reprezenta o proteină separată. Dacă la aceasta se mai adaugă și posibilitatea apariției izomerilor optici, ce decurge din însăși configurația aminoacizilor componenți, imensa varietate sub care pot să apară compușii obținuți prin condensarea aminoacizilor este mai bine subliniată. *Această pluralitate de posibilități de combinare a resturilor de aminoacizi se realizează, după anumite criterii, în funcție de specia vegetală, microbiană sau animală* (v. cap. 3).

Problema elucidării complete a structurii macromoleculare a proteinelor reprezintă pentru biochimie una dintre problemele cele mai actuale, de o incontestabilă importanță teoretică și practică.

Șirul laborioaselor investigații pe care le reclamă *stabilirea completă a structurii unei proteine* începe cu *izolarea și purificarea proteinei*, continuă cu *determinarea masei moleculare, identificarea calitativă și cantitativă a aminoacizilor componenți, stabilirea modului lor de legare, a succesiunii* (*secvenței*) exacte a tuturor aminoacizilor, în fine, a *orientării tridimensionale a macromoleculelor* ce iau naștere sau a superedificiilor moleculare pe care acestea le pot forma.

3.1.4 Determinarea masei moleculare

Dintre metodele de determinare a masei moleculare a compușilor biomacromoleculari în cazul proteinelor sînt utilizate:

Metoda presiunii osmotice se bazează pe relația:

$$\frac{\pi}{CRT} = \frac{1}{M} + BC, \text{ de unde } M = \frac{CRT(1 + BC)}{\pi}$$

în care R este constanta generală a gazelor; T — temperatura absolută; C — concentrația proteinei (g/l) și π — presiunea osmotică a proteinei (în atmosfere) care se determină cu ajutorul unui osmometru prevăzut cu o membrană semipermeabilă de colodiu (fig. 3.4 *a*); B — constantă și M — masă moleculară.

Utilizarea metodei ridică însă probleme datorită faptului că în soluții acide, în care proteinele există sub formă de cationi sînt prezenți și ioni Cl^-, iar în soluțiile bazice în care proteinele se comportă ca anioni, există și ioni de Na^+. Acești ioni cu masă mică pot difuza prin membrane semi-

permeabile (impermeabile pentru ionii macromoleculari ai proteinei) mărind astfel presiunea osmotică de acea parte a membranei în care se află și proteina (*efect* D o n n a n) și denaturînd astfel rezultatul măsurătorii. Acest inconvenient poate fi exclus utilizîndu-se ca solvent o soluție

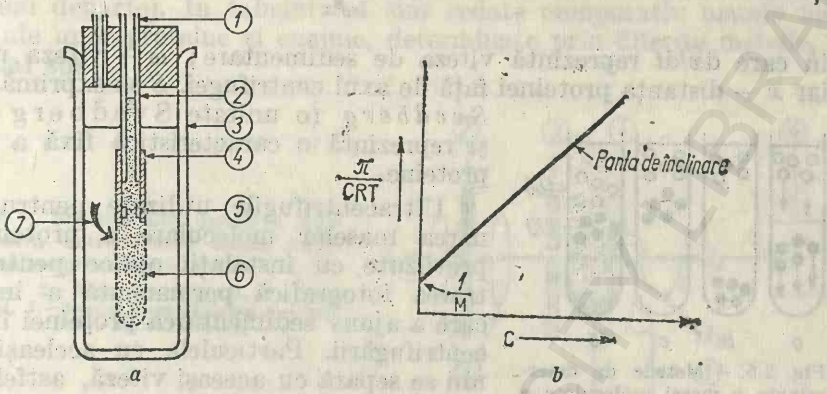


Fig. 3.4. — *a*. Reprezentarea schematică a unui osmometru:
1 — capilar, *2* — înălțimea lichidului în tubul capilar, *3* — înălțimea solventului în vas, *4* — parte de legătură dintre capilar și membrana semipermeabilă, *6*, *5* — dispozitiv de sticlă care facilitează legătura dintre *4* și *6*, *6* — membrană semipermeabilă, *7* — direcția de migrare a lichidului. *b*. Determinarea grafică a masei moleculare folosind metoda osmometrică.

salină concentrată, care trece liber prin membrana utilizată, astfel că presiunea osmotică determinată este datorită exclusiv proteinei aflată în soluție (depinde de numărul particulelor din soluție). Masa moleculară se poate calcula grafic (fig. 3.4, *b*).

Metoda ultracentrifugării a fost inițiată de S v e d b e r g și se bazează pe posibilitatea stabilirii maselor unor particule foarte mari prin determinarea vitezei lor de sedimentare sub acțiunea unui cîmp gravitațional de o anumită forță, realizat cu ajutorul unor ultracentrifuge cu cîmpuri gravitaționale de 400 000 de ori mai puternice decît gravitația și cu rotații de ordinul a 80 000 rotații pe minut. Proteinele sedimentează în eprubete de centrifugă în raport cu mărimea moleculelor și masa lor moleculară. Masa moleculară se determină conform relației:

$$M = \frac{RT \ln X_2/X_1}{\omega^2 D(1 - V_s d)(t_2 - t_1)},$$

în care: R și T au semnificațiile cunoscute; X_2 și X_1 sînt distanțele parcurse de stratul care sedimentează în intervalul de timp $t_2 - t_1$; ω — viteza unghiulară; D — constanta de difuziune (care se poate afla printr-o determinare separată); V_s — volumul specific parțial al proteinelor (volumul ocupat de 1 g proteină solvită); d — densitatea soluției.

O altă variantă a metodei ultracentrifugării, mai simplă și mai des utilizată face apel la relația:

$$M = \frac{R \cdot T \cdot S}{D(1 - V_s \cdot d)},$$

în care apare valoarea S numită *constanta de sedimentare*, care este o măsură a masei moleculare a proteinei. Această constantă reprezintă de fapt

viteza de sedimentare într-un cîmp centrifugal de o unitate C.G.S. şi are valoarea:

$$S = \frac{dx/dt}{\omega^2 x},$$

în care dx/dt reprezintă viteza de sedimentare; ω — viteza unghiulară iar x — distanţa proteinei faţă de axul centrifugei. S se exprimă în *unităţi Svedberg* (o unitate Svedberg $= 10^{-13}$ s) şi reprezintă o caracteristică fixă a diferitelor proteine.

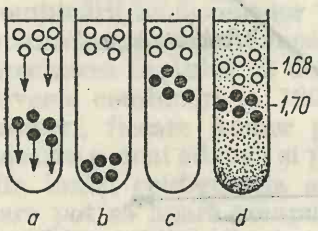


Fig. 3.5. — Metode de determinare a masei moleculare a biopolimerilor:

a — prin viteza de sedimentare (viteză de centrifugare mare, timp scurt), *b* — prin echilibru de sedimentare (viteză mică, timp îndelungat), *c* — metoda Archibald (viteză mică, timp scurt), *d* — sedimentarea în gradient de densitate (viteză moderată, timp moderat, în soluţii cu gradient de densitate).

Ultracentrifugile utilizate pentru determinarea maselor moleculare a proteinelor sînt prevăzute cu instalaţii optice pentru înregistrarea fotografică permanentă a înălţimii la care a ajuns sedimentarea proteinei în decursul centrifugării. Particulele cu aceleaşi dimensiuni se separă cu aceeaşi viteză, astfel că apare o limită netă (bandă) de separaţie între solvent şi substanţa din soluţie (fig. 3.5). Dacă soluţia conţine un amestec de proteine vor apărea mai multe benzi separate. Datorită acestui fapt metoda ultracentrifugării poate fi folosită pentru controlul purităţii unei soluţii de proteine. Aceasta cu atît mai mult cu cît metoda ultracentrifugării determină masa moleculară care reprezintă masele efective ale particulelor din soluţie şi nu valori medii ale lor, aşa cum se obţin în cazul metodei de determinare a masei moleculare prin presiunea osmotică.

Metoda difuziunii luminii se bazează pe *proprietatea soluţiilor coloidale pe care le dau proteinele de a difuza o parte din lumina incidentă* şi pe faptul *că intensitatea de difuziune a luminii este dependentă de numărul particulelor din soluţie* (concentraţie) *şi de masa lor moleculară.*

Masa moleculară se determină conform relaţiei:

$$\frac{i_\theta}{I_0} = \frac{2\pi^2(1 + \cos^2\theta)\eta_0^2(d\eta/dc)^2 Mc}{N\lambda^4 r^2},$$

în care: θ este unghiul sub care difuziunea luminii a fost înregistrată; η, η_0 — indicii de refracţie a soluţiei şi respectiv al solventului; c — concentraţia proteinei; λ — lungimea de undă, în nm, a luminii incidente; r — distanţa de la probă la fotocelulă; N — numărul lui *Avogadro*; I_0 — intensitatea luminii incidente; i_θ — intensitatea luminii difuzate, iar M — masa moleculară a proteinei.

O schemă a instalaţiilor folosite în scopul determinării masei moleculare prin metoda difuziunii luminii este redată în figura 3.6.

Metoda ultrafiltrării utilizează membrane de porozitate cunoscută şi se determină *capacitatea moleculelor proteice solvite de a trece sau nu prin aceste membrane.* Determinarea masei moleculare a proteinelor a scos în evidenţă faptul că masele moleculare determinate prin această metodă

variază în limite foarte largi, din care cauză ea este folosită mai rar și uneori numai ca mijloc de verificare a valorilor obținute prin alte metode.

Pentru determinarea masei moleculare a proteinelor și enzimelor se poate folosi și *microscopul electronic*, precum și *metoda difracției razelor X* (vezi mai departe). În tabelul 3.4 sînt redate comparativ masele moleculare ale unor proteine și enzime, determinate prin diferite metode, expuse mai sus.

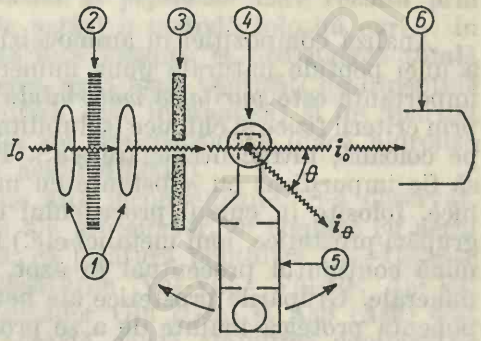


Fig. 3.6. — Schema unei instalații folosite pentru determinarea masei moleculare prin difuzia luminii:
1 — prisme, *2* — filtru, *3* — diafragmă, *4* — probă de analizat, *5* — detector fotomultiplicator, *6* — fantă pentru lumina incidentă.

În legătură cu problema maselor moleculare ale proteinelor s-a stabilit faptul că în cazurile în care acestea depășesc cifra de aproximativ 850 000

TABELUL 3.4

Masa moleculară comparativă a unor proteine și enzime determinată prin metode diferite

Denumirea metodei / *Proteina*	*Presiune osmotică*	*Ultra-centrifugare*	*Difuziunea luminii*	*Difracția de raze X*
Ovalbumina	45 000—46 600	43 800—45 000	45 700—46 000	—
Serum albumina	66 000—76 000	65 380—70 200	72 500	65 600—66 200
Hemoglobina	67 000	68 000	—	66 700
Lizozim	17 500	14 000—17 000	14 700	13 900

* — Nu s-a determinat masa moleculară prin metoda respectivă

se poate vorbi despre *agregate macromoleculare* alcătuite din mai multe *micromolecule asociate* sub influența unor forțe de atracție intermoleculare (vezi structura cuaternară a proteinelor, pag. 141), astfel că în aceste cazuri însăși termenul de „masă moleculară" este interpretabil. Aceste agregate moleculare pot fi disociate prin diverse mijloace și un exemplu concludent în acest sens îl oferă *hemocianinele* (pigmenții respiratori ai melcilor și crustaceilor) la care determinarea masei moleculare prin metoda ultracentrifugării dă valori de ordinul $6{,}6 \times 10^6$. Prin variația *p*H soluției se obțin prin aceeași metodă valori de 2, 4, 8 și chiar 16 ori mai mici, valori care însă revin la cea inițială ($6{,}6 \times 10^6$) odată cu restabilirea *p*H inițial. Și în cazul determinării masei moleculare a insulinei (care de fapt e o polipeptidă) prin diverse metode au fost obținute în diverse condiții valori

de 48 000, 36 000, 12 000 și de 6 000. Aceste două exemple sînt suficiente pentru a ilustra faptul că în general *proteinele native sînt agregate macromoleculare complexe* care pot fi disociate sub influența diverșilor agenți în molecule, care posedă parametrii fizico-chimici caracteristici proteinelor native.

3.2. HIDROLIZA PROTEINELOR ȘI PEPTIDELOR NATURALE

Analiza compoziției în aminoacizi a unei molecule proteice native sau a unei peptide naturale pune numeroase probleme printre care cea mai importantă este *puritatea materialului folosit pentru hidroliză*, determinată prin criterii fizice și chimice (solubilitate, electroforeză în gel, cromatografie pe coloană, ultracentrifugare ș.a.). Preparatul supus analizei nu trebuie să fie impurificat cu substanțe cu masă moleculară mică (săruri anorganice, folosite în cursul procedeului de purificare, lipide neutre, glucide, grupări prostetice, ioni metalici etc.) în care scop se liofilizează și se determină conținutul procentual în azot, fosfor, monozaharide, apă și săruri minerale. Grupările prostetice ale heteroproteidelor sînt separate de componenta proteică înainte de a se proceda la hidroliza acesteia printr-una din metodele descrise în continuare.

3.2.1 Hidroliza acidă a peptidelor și proteinelor

Proteina supusă analizei este liofilizată și redizolvată în soluție de acid clorhidric 5,7 *N* la care se adaugă cîteva picături de fenol 5%. În fiola în care a fost realizat amestecul de hidroliză se introduce azot sau se face vid cu ajutorul unei pompe de vid și apoi se încălzește pe o baie de apă la 40°C timp de 30 s, agitîndu-se ușor, în scopul îndepărtării totale a oxigenului din spațiul rămas liber în fiolă. Prezența oxigenului în timpul hidrolizei proteinei duce la oxidarea unor aminoacizi și la modificarea rezultatelor hidrolizei. Hidroliza se efectuează, de regulă, la 105—110°C, în fiole din sticlă Pyrex sau Jena, timp de 24—72 ore, după care conținutul fiolei se răcește și acidul este îndepărtat într-un evaporator-rotator. Reziduul este dizolvat într-un volum restrîns de apă distilată deionizată și din nou evaporat la sec.

Pentru analiza aminoacizilor prezenți în hidrolizat se folosesc *analizoare automate de aminoacizi, cu înregistrare automată*, care furnizează direct datele necesare calculării conținutului procentual al fiecărui aminoacid prezent în proteina analizată. De regulă, pentru obținerea unor rezultate corecte se utilizează 0,4—0,5 mg de proteină pură.

Hidroliza proteinelor se poate realiza și *cu acid performic* (la 9 ml de acid formic 80% se adaugă 1 ml de peroxid de hidrogen 30% și amestecul se lasă în repaus 30 min. la 4°C). Acest procedeu se utilizează mai rar deoarece proteinele și peptidele care urmează să fie hidrolizate cu acid performic trebuie reduse și carboximetilate pentru protejarea unor grupări reactive (grupările SH ale resturilor de cistină, cisteină și metionină). Proteinele și peptidele alchilate sînt greu solubile în apă din care cauză ele sînt suspendate în apă bidistilată și liofilizate.

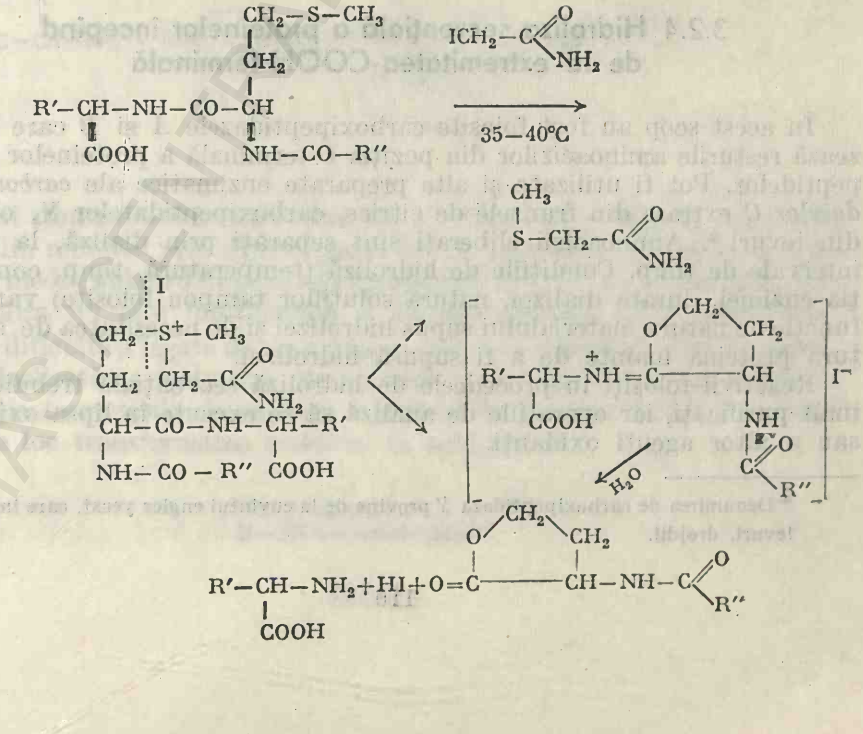
Indiferent de agentul folosit pentru hidroliza proteinelor și peptidelor hidroliza acidă a acestora este întotdeauna însoțită de oxidarea resturilor unor aminoacizi: cisteina și cistina sînt transformate în *acid cistic*, metionina în *metioninsulfonă*, tirozina și triptofanul sînt complet distruse, treonina și serina oxidate în proporție de aproximativ 5—10%. Pentru evitarea unor asemenea dezavantaje ale hidrolizei acide s-a propus efectuarea unei hidrolize acide la diferite intervale de timp (24, 48 și 72 ore) și extrapolarea rezultatelor obținute la „timpul zero".

Hidroliza acidă parțială a proteinelor și peptidelor care rezultă prin aplicarea acestui procedeu, constituie astăzi o metodă folosită curent în laboratoarele de biochimie, dar și ea este însoțită la distrugerea totală a resturilor de triptofan, de producerea unei mari cantități de dipeptide (aproximativ 25% din materialul inițial, luat în analiză) și de apariția unor artefacte, ca urmare a reacțiilor de transpeptidare (dacă hidroliza se efectuează, în special, în soluții acide diluate).

Hidroliza acidă este însoțită și de alte inconveniente. S-a observat, de exemplu, că în hidrolizatele acide ale proteinelor, în contact cu aerul poluat, tirozina trece în *nitrotirozină*, că legătură peptidică Ile—Ile este rezistentă la hidroliza acidă, iar legăturile Val-Val, Val-Ile, Ile-Val sînt hidrolizate greu, amidele aminoacizilor Glu (Gln) și Asp (Asn) sînt transformate în acizi ș.a.m.d. Din această cauză stabilirea compoziției aminoacizilor dintr-o moleculă de proteină sau de polipeptidă se realizează și prin alte metode de hidroliză, care prezintă alte avantaje față de metoda hidrolizei acide.

3.2.2 Scindarea proteinelor cu bromcian sau cu iodacetamidă

Metoda se bazează pe faptul că în mediu acid bromcianul sau iodacetamina scindează specific legăturile peptidice formate de resturile de Met cu formare de lactonă a homoserinei după următoarele reacții:



Scindările cu bromcian și cu iodacetamidă sînt folosite frecvent pentru cercetarea structurii proteinelor, deoarece ele dau posibilitatea obținerii unor fragmente polipeptidice relativ mari care separate pot fi ulterior analizate, hidrolizate prin alte metode (gel filtrare, cromatografie pe DEAE-și CM-celuloză, în prezență de uree, hidroliză acidă sau hidroliză enzimatică etc.).

3.2.3 Hidroliza secvențială sau succesivă a proteinelor începînd de la extremitatea -NH_2-terminală

Această metodă poartă și denumirea de *metoda degradării* proteinelor după E d m a n și folosește ca reactiv *feniltioizocianatul*. Proteina a cărei secvență urmează să fie determinată se dizolvă în soluție tampon de dimetilalilamină preparată în propanol-1 și ajustată la *p*H 9,5 cu acid trifluoroacetic. După evacuarea oxigenului din recipientul în care a fost dizolvată proteina și crearea unei atmosfere inerte de azot sau a unui vacuum moderat se adaugă feniltioizocianat și conținutul recipientului se încălzește la 50°C timp de 20 minute, se evaporă la 40°C în curent de azot și se usucă la sec într-un exicator de vid și deasupra $CaCl_2$. Derivații rezultați sînt extrași cu benzen (se păstrează atmosfera de azot) și eșantioanele sînt evaporate din nou la sec, tratate cu acid trifluoroacetic și încălzite la 50°C timp de 7 minute. Acidul trifluoroacetic este îndepărtat prin evaporare și reziduul este extras de 3 ori cu eter fără urme de peroxizi. Extractele eterice sînt reunite, evaporate la sec și tratate cu HCl soluție *N* la temperatura de 80°C timp de 3 minute. Fenilhidroantoinele aminoacizilor N-terminali sînt identificate prin *cromatografie în strat subțire* sau prin *cromatografie de partiție gaz-lichid*.

3.2.4 Hidroliza secvențială a proteinelor începînd de la extremitatea-COOH-terminală

În acest scop au fost folosite carboxipeptidazele *A* și *B* care hidrolizează resturile aminoacizilor din poziția C-terminală a proteinelor și polipeptidelor. Pot fi utilizate și alte preparate enzimatice ale *carboxipeptidazelor C* extrase din frunzele de citrice, carboxipeptidatelor Y, obținute din levuri *. Aminoacizii eliberați sînt separați prin dializă, la diferite intervale de timp. Condițiile de hidroliză (temperatură, timp, concentrația enzimei, durata dializei, natura soluțiilor tampon folosite) variază în funcție de natura materialului supus hidrolizei și de necesitatea de a denatura proteina înainte de a fi supusă hidrolizei.

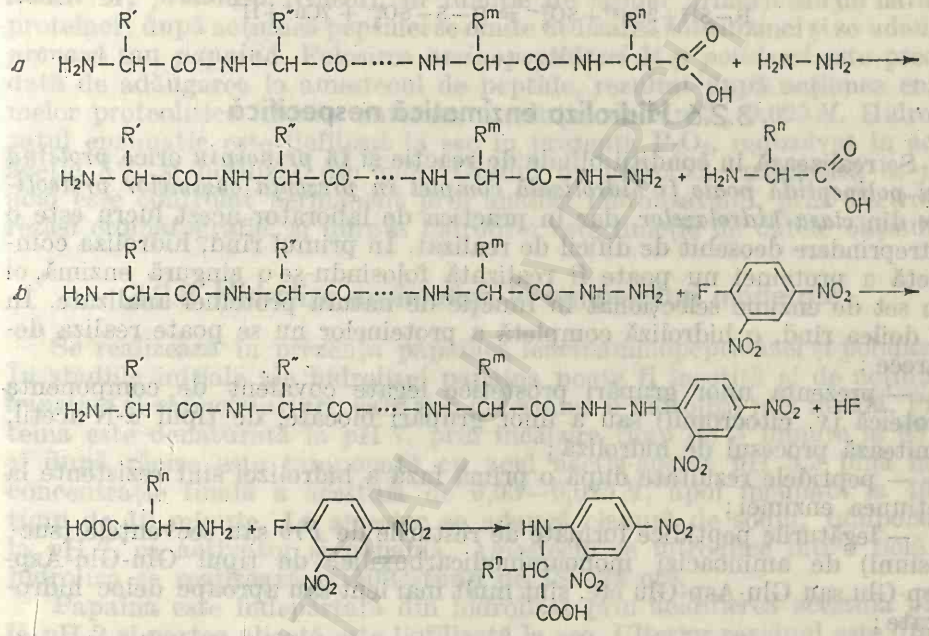
Reactivii folosiți în procedeele de hidroliză secvențială trebuie să fie înalt purificați, iar operațiile de analiză să se execute în lipsa oxigenului sau a altor agenți oxidanți.

---

* Denumirea de carboxipeptidaza *Y* provine de la cuvîntul englez yeast, care înseamnă levuri, drojdii.

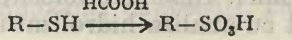
3.2.5 Hidrazinoliza

Este o altă metodă chimică de scindare treptată a catenei polipeptidice începînd de la extremitatea C-terminală, dar în cursul reacției Cys se distruge, Met se oxidează cu formarea sulfonei respective, Arg se transformă în ornitină prin pierderea grupării guanidino, iar Asn și Glu sînt complet distruși. În cursul reacției de hidrazinoliză toate legăturile peptidice sînt rupte și toți aminoacizii, *cu excepția aminoacidului C-terminal*, trec în hidrazide. Natura aminoacidului C-terminal poate fi evidențiată fie cu ajutorul reactivului 2, 4-dinitrofluorobenzen sau cu clorură de dansil. În principiu reacțiile de hidrazinoliză pot fi redate schematic astfel:



Cei doi dinitrofluorobenzen derivați au solubilități diferite și pot fi separați din amestec prin diferite procedee de extracție. Hidroliza se realizează în mediu anhidru în prezența hidrazinei, timp de 6—16 ore la 115°C. Hidrazinoliza nu este întotdeauna o metodă comodă sau convenabilă.

Unele dificultăți legate de prezența în molecula proteinei, care urmează să fie hidrolizată, a resturilor de cisteină și cistină sînt preîntîmpinate prin reacția ireversibilă de oxidare a proteinelor cu acid formic în cursul căreia are loc transformarea cisteinei în acid cisteic:



iar ruperea legăturilor S—S din cistină sau dintre catenele polipeptidice ale unei proteine se realizează şi prin reacţii de reducere şi blocare ulterioară a grupărilor SH rezultate :

$$R'-S-S-R'' \xrightarrow{-2H} R'-SH+R''SH$$

$$R'SH + R''SH \xrightarrow[Br_2]{2BrCH_2COOH} R'-S-CH_2COOH+R''-S-CH_2COOH$$

Un alt procedeu de reducere a punţilor disulfurice —S—S— este reacţia de *sulftioliză* cu formare de *S-sulfonaţi*, care are loc în prezenţa Cu^{2+} (reacţia este folosită rar) :

$$R-S-S-R+2Cu^{2+}+2SO_3^{2-} \rightleftharpoons {}_2R-S-SO_3^- +2Cu^+$$

$$R-SH+2Cu^{2+}+SO_3^{2-} \rightleftharpoons R-S-SO_3^- + 2Cu^+ + H^+$$

3.2.6 Hidroliza enzimatică nespecifică

Se realizează în condiţii blînde de reacţie şi *în principiu* orice *proteină sau polipeptidă poate fi hidrolizată complet în prezenţa enzimelor proteolitice* din *clasa hidrolazelor*, dar în practica de laborator acest lucru este o întreprindere deosebit de dificil de realizat. În primul rînd, hidroliza completă a proteinei nu poate fi realizată folosindu-se o singură enzimă, ci un set de enzime selecţionat în funcţie de natura proteinei analizate. În al doilea rînd, o hidroliză completă a proteinelor nu se poate realiza deoarece :

— prezenţa unor grupări prostetice legate covalent de componenta proteică (v. citocromii) sau a unor grupări blocate, de tipul α-N-acetil, limitează procesul de hidroliză ;

— peptidele rezultate după o primă fază a hidrolizei sînt rezistente la acţiunea enzimei ;

— legăturile peptidice formate de resturile de *Pro* sau secvenţele (succesiuni) de aminoacizi monoaminodicarboxilici de tipul Glu-Glu-Asp-Asp-Glu sau Glu-Asp-Glu etc. sînt mult mai lent sau aproape deloc hidrolizate ;

— este dificil de a menţine mult timp proteina în stare denaturată, în condiţiile unei hidrolize blînde (este binecunoscut faptul că proteinele native sînt greu hidrolizate de enzime, manifestînd faţă de acestea o rezistenţă apreciabilă) ;

— în cursul hidrolizei acidul glutamic se ciclizează cu formare de acid piroglutamic, ceea ce determină o micşorare a cantităţii acestuia în hidrolizate ; dacă un rest de acid glutamic se găseşte la extremitatea N-terminală a proteinei sau a peptidei hidroliza acestora de către enzime este lentă şi incompletă.

Din considerentele expuse în practică se aplică procedeul *hidrolizei enzimatice complexe* cînd se folosesc mai multe proteaze, de obicei endopeptidaze mai mult sau mai puţin specifice, pentru a transforma proteina în fragmente peptidice mai mici. Enzimele folosite în aceste scopuri trebuie să fie pure şi concomitent cu analiza hidrolizatului enzimatic se realizează

și probe de control privind enzima și se introduc corecțiile necesare. În cele ce urmează vor fi expuse pe scurt unele procedee de hidroliză enzimatică care sînt utilizate mai frecvent și cu bune rezultate în studiul compoziției și secvenței aminoacizilor proteinelor și polipeptidelor.

3.2.7 Hidroliza enzimatică la pH acid

Este utilizată în cazul proteinelor care pot fi menținute în stare denaturată sau sînt denaturate într-o proporție mare la valori de *p*H acide. Denaturarea proteinelor se realizează, de obicei, cu clorură de guanidină 6*M* sau de uree deionizată 8*M*, urmată de dializa în prezența unei soluții de acid formic 5%, la temperatura camerei și la *p*H 2. La proteina astfel denaturată se adaugă *pepsină*, *subtilizină* sau *subtilopeptidază*, *aminopeptidază M*, *prolidază*. Uneori, în funcție de scopul urmărit sau de natura proteinei după acțiunea pepsinei se omite utilizarea subtilizinei și se adaugă *pronază* sau *papaină*. Folosirea *aminopeptidazei M* și *polidazei* este precedată de adăugarea la amestecul de peptide, rezultat după acțiunea enzimelor proteolitice folosite anterior, a soluției de $MnCl_2$, 0,025*M*. Hidrolizatul enzimatic este liofilizat la sec în prezența P_2O_5, redizolvat în acid acetic 5% și liofilizat din nou. Gradul de hidroliză enzimatică la *p*H acid este controlat permanent prin analiza hidrolizatului, prin electroforezăși cromatografie, și durata hidrolizei este funcție de datele obținute.

3.2.8 Hidroliza enzimatică la temperaturi moderate

Se realizează în prezența papainei, leucinaminopeptidazei și polidazei. În stadiile inițiale ale hidrolizei papaina poate fi însoțită și de acțiunea *tripsinei* și *chimotripsinei*, care pot determina o hidroliză mai rapidă. Proteina este denaturată la *p*H 7, prin încălzire timp de 3 minute la 95°C, și după răcire este tamponată cu acid acetic-acetat *p*H 5,2 pînă la o concentrație finală a acestuia de 0,03—0,025*M*, apoi incubată la 40°C timp de 10 minute. La amestec se adaugă cianură de sodiu, tamponată la *p*H 7, ca activator și papaină. Amestecul se introduce într-o fiolă și hidroliza se realizează la 40°C timp de 18—24 ore.

Papaina este îndepărtată din hidrolizat prin acidifierea acestuia pînă la *p*H 2 și partea alicotă este liofilizată la sec. Ulterior reziduul este dizolvat în 1—2 ml apă distilată deionizată.

Amestecul de peptide rezultat este adus la *p*H 8,4—8,6 cu soluție diluată de NaOH, se adaugă soluție tampon Tris și leucinaminopeptidază și prolidază și din nou hidrolizat la 40°C timp de 15—24 ore. Enzimele sînt inactivate prin acidifierea amestecului cu HCl 1*N*, pînă la *p*H 2 și partea alicotă este folosită pentru determinarea aminoacizilor.

3.2.9 Hidroliza enzimatică specifică

Metoda rezidă în folosirea unor preparate pure de tripsină și chimotripsină, enzime care hidrolizează specific legăturile peptidice formate prin participarea unor aminoacizi cunoscuți. De exemplu, tripsina hidro-

lizează ușor legăturile peptidice covalente formate de resturile de Lys și Arg, dar nu atacă legăturile Lys-Pro, Arg-Pro ; alte legături peptidice de tipul Lys-Lys-X, Lys-Lys sau Arg-Arg, Lys-Arg sau Arg-Lys sînt parțial rezistente la acțiunea tripsinei.

Chimotripsina hidrolizează legăturile peptidice la care participă resturile de *Tyr*, *Phe* și *Leu* ; legăturile de tipul Leu-Leu, Phe-Phe, Tyr--Phe sînt parțial rezistente la acțiunea chimotripsinei, iar peptidele Pro--Pro (prolinei) sînt total rezistente, nehidrolizabile.

3.2.10 Hidroliza cu enzime insolubilizate

Enzimele legate covalent pe suporturi insolubile a fost utilizată în 1973 de Brown și Wold, aplicînd procedeul de legare a enzimelor descris de Cuatrecasas. Metoda prezintă unele avantaje incontestabile, printre care îndepărtarea ușoară a enzimelor din mediul de reacție, simplificarea procedurii de analiză prin eliminarea probelor martor și altele. Brown și Wold (1973) au folosit *aspergilopeptidază A* legată pe agaroză, la *p*H 1,5—2,0 pentru hidroliză, *pronază*, *aminopeptidază M*, *prolidază* — legate pe agaroză la *p*H 7,6, iar îndepărtarea enzimelor din mediul de reacție (hidrolizat) s-a realizat prin filtrare sau centrifugare, urmată de spălarea corespunzătoare a precipitatelor.

Hidroliza enzimatică a proteinelor cu tripsină, chimotripsină, pepsină și papaină constituie azi o metodă curentă a laboratoarelor de biochimie în studiul structurii proteinelor și peptidelor. Modul de acțiune al acestor enzime este descris în capitolul 6. În figura 3.7 este redată schematic acțiunea pepsinei și tripsinei asupra catenelor polipeptidice ale insulinei.

Aplicarea metodelor de analiză a proteinelor în scopul stabilirii structurii acestora se realizează eșalonat, fiecare metodă dînd informații pre-

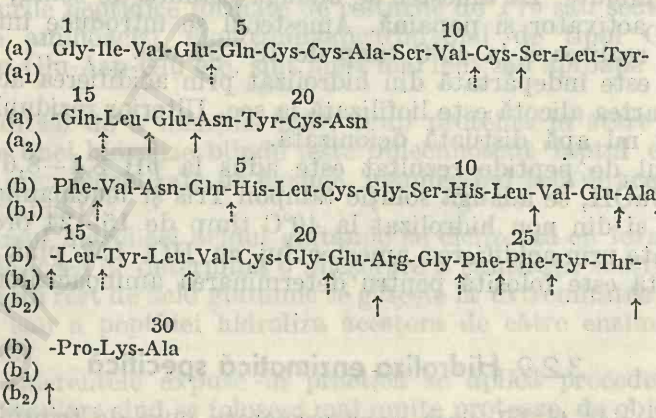
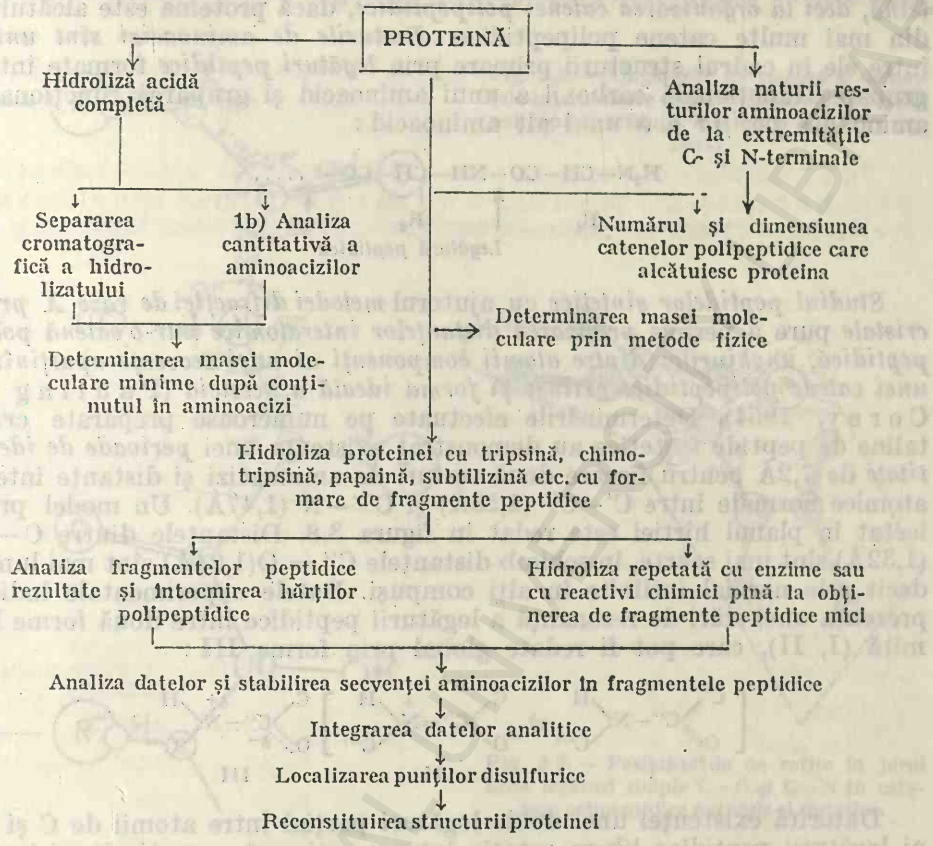


Fig. 3.7.— Legăturile peptidice din catenele A(a, a_1, a_2) și B(b, b_1, b_2) ale insulinei și legăturile care sînt hidrolizate de pepsină (→) și rennină (⇢).

cise asupra unor parametri bine definiţi. O schemă de principiu a stabilirii structurii unei proteine este redată mai jos:

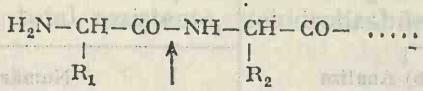


3.3. CONFORMAŢIA PROTEINELOR

Fiecare *moleculă proteică nativă prezintă o formă tridimensională caracteristică*, funcţie de dispoziţia spaţială a catenei (sau catenelor) polipeptidice din care este formată. Dispoziţia catenelor polipeptidice în spaţiu poartă denumirea de *conformaţie*. Datorită faptului că proteinele sînt biopolimeri macromoleculari, alcătuiţi din catene polipeptidice de dimensiuni mari şi extrem de diferite ca structură internă (dacă se admite că într-o proteină se întîlnesc 20 resturi de aminoacizi atunci numărul proteinelor diferite care sînt formate din 50 de resturi de aminoacizi va fi de 20^{50}) aşezarea lor spaţială poate fi extrem de variată, de aceea s-a hotărît introducerea unei *terminologii specifice pentru definirea nivelelor de organizare a moleculelor proteice*. Între aceste nivele de organizare nu se poate face o delimitare netă ele reprezentînd mai degrabă etape ale perfecţionării neîntrerupte ale mijloacelor fizico-chimice de investigaţie a structurii proteinelor.

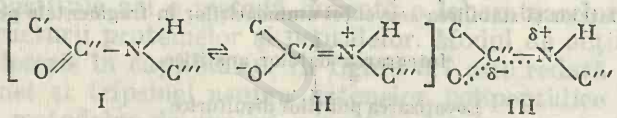
3.3.1 Structura primară a proteinelor

Se referă la *numărul și succesiunea resturilor de aminoacizi într-o proteină, deci la organizarea catenei polipeptidice,* dacă proteina este alcătuită din mai multe catene polipeptidice. *Resturile de aminoacizi sînt unite* între ele în cadrul structurii primare prin *legături peptidice* formate între gruparea funcțională carboxil a unui aminoacid și gruparea funcțională amino *din poziția* α a unui alt aminoacid :



Legătură peptidică

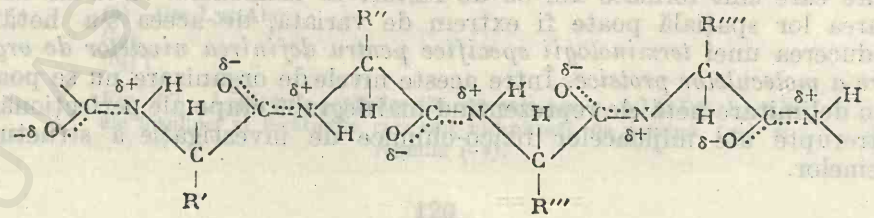
Studiul peptidelor sintetice cu ajutorul *metodei difracției de raze X prin cristale* pure a permis *precizarea distanțelor interatomice într-o catenă polipeptidică, unghiurilor dintre atomii componenți ai unei secvențe aparținînd unei catene polipeptidice extinse și forma ideală a acesteia* (P a u l i n g și C o r e y, 1954). Determinările efectuate pe numeroase preparate cristaline de peptide sintetice au demonstrat existența unei *perioade de identitate* de 7,2Å pentru fiecare două resturi de aminoacizi și distanțe interatomice normale între C′—C″ (1,53Å) și C‴—N (1,47Å). Un model proiectat în planul hîrtiei este redat în figura 3.8. Distanțele dintre C—N (1,32Å) sînt mai scurte, în schimb distanțele C″ = O(1,24Å) sînt mai lungi decît cele normal întîlnite în alți compuși. Datele experimentale indică prezența unei stări de rezonanță a legăturii peptidice între două forme limită (I, II), care pot fi redate global prin forma III :



I II III

Datorită existenței unei duble legături parțial între atomii de C și N ai legăturii peptidice libera rotație între aceștia este practic inexistentă și ei se găsesc situați în același plan și o rotație liberă este posibilă numai la nivelul atomilor C′—C″ și C‴—N (fig. 3.9). *Orientarea spațială a catenelor polipeptidice se datorește în principal numai acestor rotații libere în jurul legăturilor menționate. Poziția coplanară* a atomilor participanți la formarea legăturii peptidice creează posibilitatea unei izomerii *cis trans*, dar s-a constatat *că proteinele native și peptidele naturale conțin numai izomerul trans.*

Datorită unghiurilor de valență dintre atomi și așezării coplanare a atomilor interesați în legătura peptidică *catena polipeptidică proiectată într-un plan are forma unui zig-zag,* iar catenele laterale ale resturilor aminoacizilor constituenți sînt dispuse alternant deasupra și dedesubtul planurilor formate de legătura polipeptidică :



Proteinele formate din mai multe catene polipeptidice se numesc *proteine oligomere*, iar catenele care le alcătuiesc *protomeri*. Legăturile dintre protomeri într-o proteină oligomeră sînt *legături covalente*, dar nu de natură

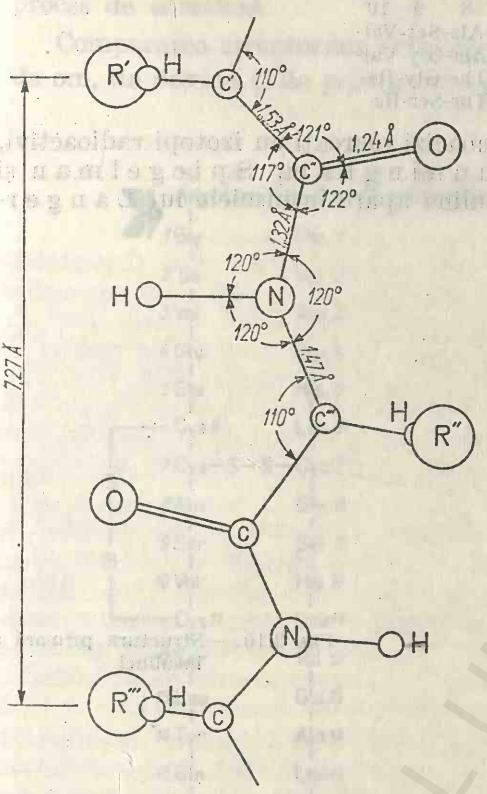


Fig. 3.8. — Unghiurile de valență și distanțele interatomice într-un fragment de catenă polipeptidică (după P a u l i n g și C o r e y, 1954).

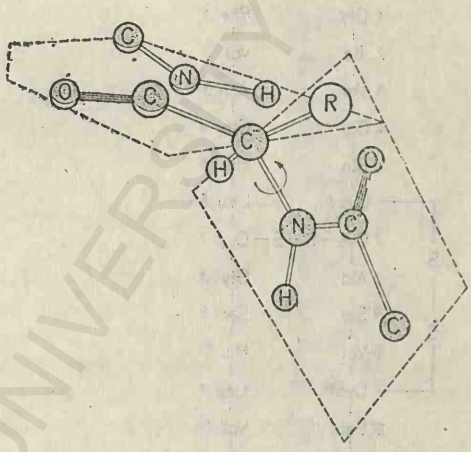


Fig. 3.9. — Posibilitățile de rotire în jurul unor legături simple C—C și C—N în catenele polipeptidice naturale și sintetice.

peptidică, formate între două resturi de aminoacizi ce aparțin la două catene polipeptidice diferite (*legături intercatenare*).

S a n g e r (1955) *reușește pentru prima dată să stabilească structura primară a unei proteine-hormon, insulina*, care are o masă moleculară de 6 000. Cîțiva ani mai tîrziu M o o r e și S t e i n stabilesc *structura primară a unei enzime ribonucleaza* (masă moleculară 13 000), iar în *prezent sînt cunoscute structurile primare ale numeroaselor proteine*, cu mase moleculare mult mai mari și care sînt *alcătuite din sute de resturi de aminoacizi*.

Insulina este alcătuită din *două catene polipeptidice*: *catena A*, care conține *21 resturi de aminoacizi* și prezintă *o punte disulfurică intracatenară* formată de *resturile de cisteină* în poziția 6—11 și

— *catena B* care este alcătuită din *30 resturi de aminoacizi*. *Cele două catene sînt legate între ele prin două punți disulfurice* formate de resturile de cisteină din pozițiile A_7—B_7 și A_{20}—B_{19} (R y l e, S a n g e r, 1955; R y l e, S a n g e r, S m i t h, K i t a i, 1955) (fig. 3.10). Puntea disulfurică intracatenară *A* este deosebit de importantă deoarece secvența aminoacizilor din „buclă" reamintește de secvența resturilor de aminoacizi

din *ocitocină* și *vasopresină*, iar aminoacizii din pozițiile *8*, *9* și *10* (*Thr*, *Ser*, *Ile*) sînt esențiali pentru caracterizarea preparatului de insulină, deoarece variază în funcție de specia mamiferelor de la care a fost izolat:

	8	9	10
Insulina de bou:	-Ala-	Ser-	Val-
oaie:	-Ala-	Gly-	Val-
cal:	-Thr-	Gly-	Ile-
umană:	-Thr-	Ser-	Ile-

În experiențele efectuate cu aminoacizi marcați cu izotopi radioactivi, Steiner (1967), Steiner, Cunningham, Spiegelman și Bradley (1967) au arătat că insulina apare în insulele lui Langer-

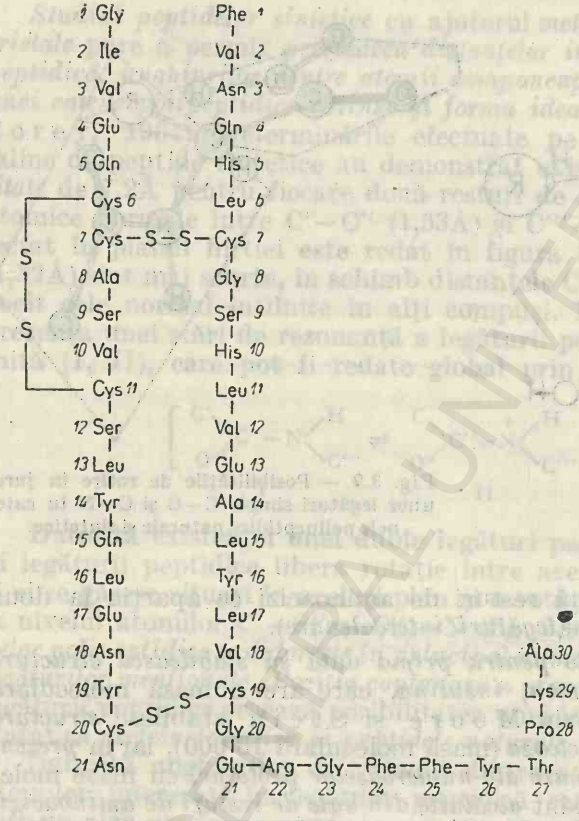


Fig. 3.10. — Structura primară a insulinei

hans sub forma unui precursor cu o masă moleculară mai mare decît cea cunoscută (6 000 de daltoni). După 30 minute, aproximativ 70% din radioactivitatea precursorului poate fi regăsită în molecula insulinei. Acest precursor a fost denumit de autorii citați *proinsulină*.

Proinsulina este alcătuită dintr-o catenă polipeptidică cu o masă moleculară de 9 000, formată din catenele *A* și *B* ale insulinei, legate între ele prin intermediul unui *fragment peptidic C* care diferă de la o specie la alta (fig. 3.11). Viața medie a proinsulinei este de aproximativ o oră, interval de timp în care proinsulina este vehiculată din ribozomii ergasto-

plasmei celulelor unde se formează în aparatul G o l g i, fiind apoi inclusă în granulele cu membrană netedă caracteristică, care iau naştere în procesul de înmugurire a membranelor G o l g i şi sînt secretate printr-un proces de *exocitoză*.

Compararea structurilor primare a *C*-peptidelor izolate din proinsulina de om, de bovine şi de porc a evidenţiat faptul că există o diferenţă mai

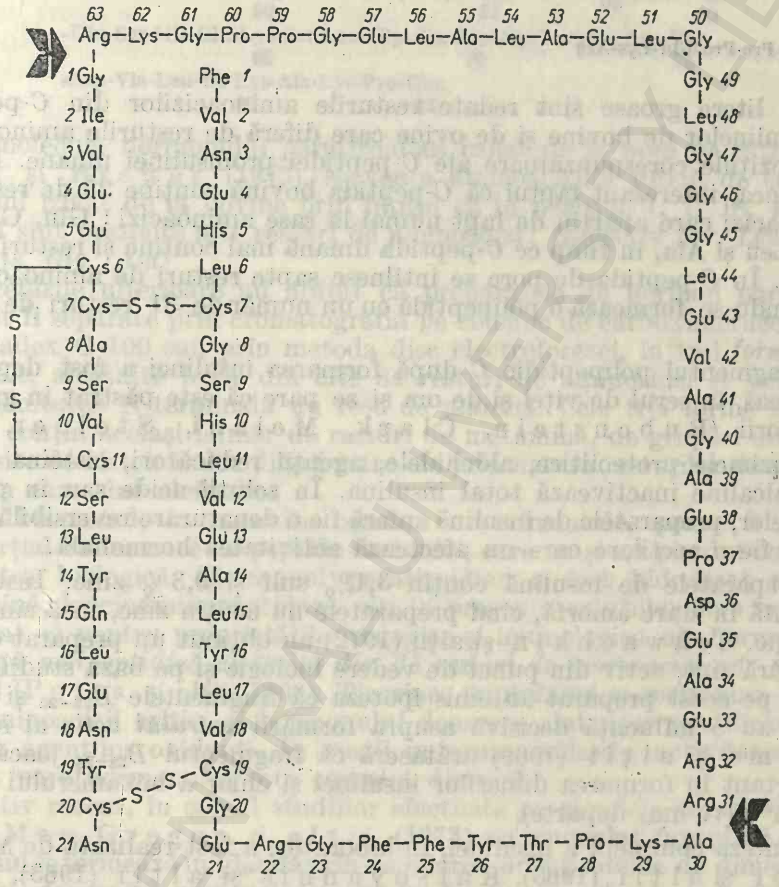


Fig. 3.11. — Structura primară a proinsulinei (catena *A* 1—21; catena *B* 1—30 şi catena *C* 31—63)

mare între aceste C-peptide decît între moleculele de insulină. Folosind hidroliza enzimatică a *C*-peptidelor cu papaină, aminopeptidază, carboxipeptidază şi chimotripsină s-a arătat că structura primară a acestora este următoarea:

C-peptida insulinei umane (1) Glu-Ala-Glu-Asp-Leu-Gln-Val-Gly-Gln-Val-
1 5 10
C-peptida insulinei bovine (2) Glu-Val-Glu-Gly-Pro-Gln-Val-Gly-Ala-Leu-
C-peptida insulinei de porc (3) Glu-Ala-Glu-Asn-Pro-Gln-Ala-Gly-Ala-Val-
(1) -Glu-Leu-Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Ala-Gly-Ser-Leu Gln-Pro-Leu-Ala-
15 20 25
(2) -Glu-Leu-Ala-Gly-Gly-Pro-Gly-Ala-Gly-Gly-Leu-Glu-Gly-Pro-Pro-
(3) -Glu-Leu-Gly-Gly-Gly-Leu-Gly-Gly-Leu-Glu-Ala-Leu-Ala-Leu-Glu-
(1) -Leu-Glu-Gly-Ser-Leu-Gln
30
(2)
(3) -Gly-Pro-Pro-Gln-Lys-Arg

Cu litere groase sînt redate resturile aminoacizilor din *C*-peptidele proinsulinelor de bovine și de ovine care diferă de resturile aminoacizilor din pozițiile corespunzătoare ale *C*-peptidei proinsulinei umane. Este de asemenea, interesant faptul că *C*-peptida bovină conține 25 de resturi de aminoacizi care aparțin de fapt numai la șase aminoacizi: Glu, Gly, Val, Pro, Leu și Ala, în timp ce *C*-peptida umană mai conține și resturi de Asp și Ser. În *C*-peptida de porc se întîlnesc șapte resturi de aminoacizi care repetîndu-se formează o polipeptidă cu un număr de 31 resturi de aminoacizi.

Fragmentul polipeptidic *C* după formarea insulinei a fost depistat în pancreas, în serul de vițel și de om și se pare că este păstrat în granulele secretorii (Rubenstein, Clark, Melani, Steiner, 1969).

Enzimele proteolitice, aldehidele, agenții reducători, cisteina și soluțiile alcaline inactivează total insulina. În soluții acide sau în prezența cetonelor, preparatele de insulină suferă fie o denaturare reversibilă (mediu acid), fie o acetilare care nu afectează activitatea hormonală.

Preparatele de insulină conțin 3,1% sulf și 0,3% zinc. Insulina se prezintă în stare amorfă, cînd preparatele nu conțin zinc, însă sînt active biologic. Schwachkin și alții (1972) au obținut un preparat de insulină fără zinc, activ din punct de vedere biologic și pe baza studiilor efectuate pe acest preparat au emis ipoteza că fragmentele B_{23-25} și Phe_{24}—Phe_{25} au o influență decisivă asupra formării *centrului activ* al insulinei. Adams și alții (1969) arătaseră că fragmentul B_{23-28} joacă un rol important în formarea dimerilor insulinei și chiar a hexamerului cu ionii de Zn^{2+} (v. mai departe).

Sinteza completă a insulinei, în laborator, a fost realizată de Meienhofer și alții (1963), Katsoyannis și alții (1963), Kung, Du, Huang, Chen (1965) și Yudaev și colab. (1973), *confirmînd total structura primară stabilită de* Sanger în 1955. Utilizarea insulinei sintetice reprezintă numai 16% în comparație cu insulina nativă, cristalizată.

Între anii 1959—1964 Aurbach (1959), Rasmussen și Sze, Young (1964), izolează din țesutul glandelor paratiroidiene delipidizate și deshidratate, prin extracție cu soluții apoase de fenol, o proteină care posedă proprietățile fiziologice ale hormonului paratiroidian, denumit și paratirină sau parathormon.

Secvența aminoacizilor în hormonul paratiroidian (paratirina) izolat din glanda paratiroidă de bou a fost stabilită și este următoarea :

```
Ala-Ser-Met-Glu-Ile-Gln-Phe-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-
 1          5                  10                  15
-Ser-Ser-Met-Glu-Arg-Val-Gln-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-
                20                  25                  30
-Val-His-Asn-Phe-Val-Ala-Leu-Gly-Ala-Ser-Ile-Ala-Tyr-Arg-Asp-
                35                  40                  45
-Gly-Ser-Ser-Gln-Arg-Pro-Arg-Lys-Lys-Glu-Asp-Asn-Val-Leu-Val-
                50                  55                  60
-Glu-Ser-His-Gln-Lys-Ser-Leu-Gly-Glu-Ala-Asp-Lys-Ala-Asp-Val-
                65                  70                  75
=Asp-Vla-Leu-Ile-Lys-Ala-Lys-Pro-Gln.
                80                  84
```

În molecula hormonului paratiroidian izolat de la porc de către Arnaud și Brewer (1975), secvența aminoacizilor diferă de cea din hormonul izolat de la bovine prin faptul că în pozițiile 1, 7, 18, 42, 43, 47 și 74 sînt prezente alte resturi de aminoacizi; respectiv *Ser*, *Leu*, *Leu*, *Val*, *His*, *Gly*, *Ala*.

Cercetările ulterioare au arătat că preparatele de hormon paratiroidian pot fi separate prin cromatografia pe coloane de carboximetilceluloză și Sephadex G-100 sau prin metoda disc electroforezei, în trei *forme izohormonale*, alcătuite toate din cîte 84 resturi de aminoacizi și posedînd la extremitatea N-terminală un rest de alanină. Cele trei forme izohormonale conțin același număr de resturi de metionină, de grupări amidice, sînt lipsite de cisteină, dar diferă între ele prin natura resturilor de aminoacizi din care sînt alcătuite.

Parathormonul, în anumite condiții experimentale, poate fi hidrolizat parțial cu formare de peptide mai mici, care nu și-au pierdut complet activitatea biologică. Hormonul paratiroidian a fost hidrolizat parțial cu tripsină, leucinaminopeptidază sau în prezența soluțiilor slab acide și s-a arătat că pentru proprietățile biologice și imunologice ale hormonului *o secvență polipeptidică alcătuită din 35 resturi de aminoacizi este absolut necesară* (Potts și alții, 1968). Tirozina, triptofanul și metionina reprezintă aminoacizii critici ai hormonului deoarece sînt ușor modificați sub acțiunea agenților oxidanți. În medii puternic oxidante, activitatea biologică a parathormonului este complet distrusă.

Relativ recent, în cursul studiilor efectuate pe glandele paratiroide de bovine, Mac Gregor și alții (1973) au semnalat faptul că parathormonul se formează în glandă prin scindarea unei proteine de dimensiuni mai mari, denumită *proparathormon* sau *fracțiunea calcemică A*. Secreția acestui prohormon are loc la nivelul ribosomilor din celulele principale ale glandelor paratiroidiene, care sînt prezente la toate speciile de animale.

Preparatele de proparathormon izolat în stare pură a permis determinarea masei moleculare a prohormonului care s-a dovedit a fi de aproximativ 12 000 daltoni, în timp ce molecula parathormonului nu are decît 9 000.

Keutmann, Dawson, Aurbach și Potts (1972) folosindu-se de un preparat hormonal hidrolizat în condiții blînde, în mediu acid, au semnalat faptul că fragmentul N-terminal care cuprinde resturile aminoacizilor din pozițiile 1—29 ale moleculei de parathormon separat de la bovine este suficient pentru a asigura un efect hormonal specific

asupra rinichiului şi celulei osoase, în timp ce Segre şi Potts (1975) menţionează că fragmentul polipeptidic care cuprinde resturile aminoacizilor din poziţiile 53—84 este total inactiv din punct de vedere biologic. La rezultate similare sau foarte apropiate ajung Tregear şi alţii (1973) şi Parson, Reit şi Robinson (1973) care semnalează că fragmentul N-terminal 1—27 este suficient pentru activitatea hormonului de origine animală, în timp ce pentru parathormonul uman este necesară prezenţa primilor 34 de aminoacizi (Brewer, Fairwell, Ronan, Sizemore Arnaud, 1972).

Un exemplu semnificativ în sprijinul afirmaţiei că structura primară a proteinelor este importantă pentru asigurarea unor proprietăţi biologice îl constituie şi hormonul β-lipotrop sau lipotropina.

Hormonul β-lipotrop a fost izolat pentru prima oară de Li şi colab. (1964, 1965) din hipofiza de oaie, dovedindu-se a fi o polipeptidă alcătuită din 90 resturi de aminoacizi. Concomitent, Ryszka şi Khokhlov (1965) izolează din hipofiza de bou, porc şi berbec un hormon de natură polipeptidică pe care-l denumesc lipotropina şi remarcă că preparatele hormonale de provenienţe diferite nu se deosebesc în mod esenţial între ele.

În 1968, Graf şi Cseh izolează din hipofiza de porc un hormon β-lipotropic, reuşesc să-l purifice pe coloane de CM-celuloză şi să-i stabilească compoziţia aminoacizi.

În figura 3.12 sînt redate structurile primare ale moleculelor de hormon β-lipotropic, izolate din hipofizele de oaie şi de bou.

```
      1                 5                 10
(a) : Glu-Leu-Ala-Gly-Ala-Pro-Pro-Glu-Pro-Ala-Arg-Asp-Pro-Glu-
(b) : Glu-Leu-GLY-THR-GLU-ARG-LEU-Glu-GLN-Ala-Arg-GLY-Pro-Glu-
(c) : Glu-Leu-THR-GLY-Ala-Pro-Pro-Glu-Pro-Ala-Arg-Asp-Pro-Glu-
      15                20                25
(a) : -Ala-Pro-Ala-Glu-Gly-Ala-Ala-Ala-Arg-Ala-Glu-Leu-Glu-Tyr-
(b) : -Ala-Ala-GLU-Glu-SER-Ala-Ala-Ala-Arg-Ala-Glu-Leu-Glu-Tyr-
(c) : -Ala-GLN-ALA-Glu-Gly-Ala-Ala-Ala-Arg-Ala-Glu-Leu-Glu-Tyr-
            30                35                40
(a) : -Gly-Leu-Val-Ala-Glu-Ala-Gln-Ala-Ala-Glu-Lys-Lys-Asp-Glu-
(b) : -Gly-Leu-Val-Ala-Glu-Ala-Gln-Ala-Ala-Glu-Lys-Lys-Asp-SER-
(c) : -Gly-Leu-Val-Ala-Glu-Ala-Gln-Ala-Ala-Glu-Lys-Lys-Asp-Glu-
                45                50                55
(a) : -Gly-Pro-Tyr-Lys-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-
(b) : -Gly-Pro-Tyr-Lys-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-
(c) : -Gly-Pro-Tyr-Lys-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-
                    60                65                70
(a) : -Lys-Asp-Lys-Arg-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-
(b) : -Lys-Asp-Lys-Arg-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-
(c) : -Lys-Asp-Lys-Arg-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-
                        75                80
(a) : -Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile-Val-Lys-
(b) : -Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile-LYS-Lys-
(c) : -Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-The-Lys-Asn-Ala-Ile-Val-Lys-
      85                90  91
(a) : -Asn-Ala-His-Lys-Lys-Gly-Gln.
(b) : -Asn-HIS-ALA-Lys-GLY-GLN.
(c) : -Asn-Ala-His-Lys-Lys-Gly-Gln.
```

Fig. 3.12. — Structura primară a β-LPH :
a de porc, *b* de oaie, după datele experimentale raportate de Cseh, Graf şi Sutka, 1973, Pankov şi Yudaev, 1972, Li şi colab., 1965; *c* —β—LPH de oaie, reanalizat după metoda Edman de către Chretien şi Gilardeau, 1972.
Aminoacizii care diferă în structurile β-LPH de diverse provenienţe sînt scrişi cu litere groase.

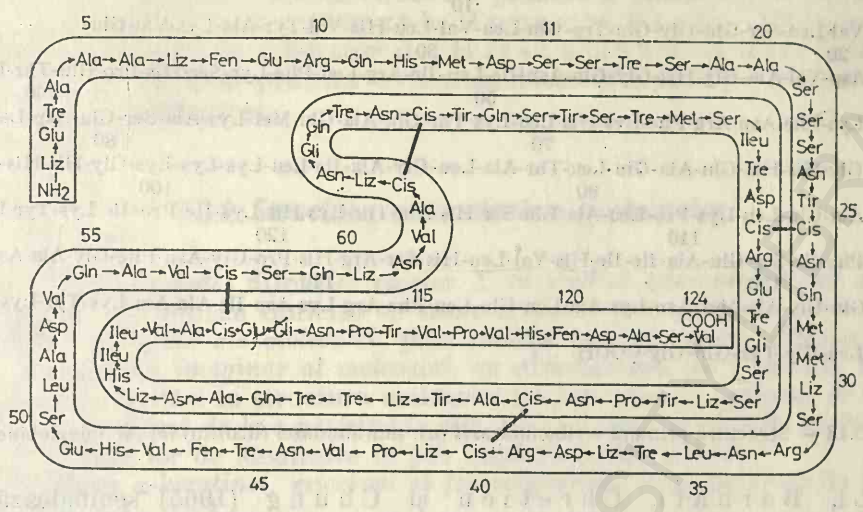


Fig. 113 a

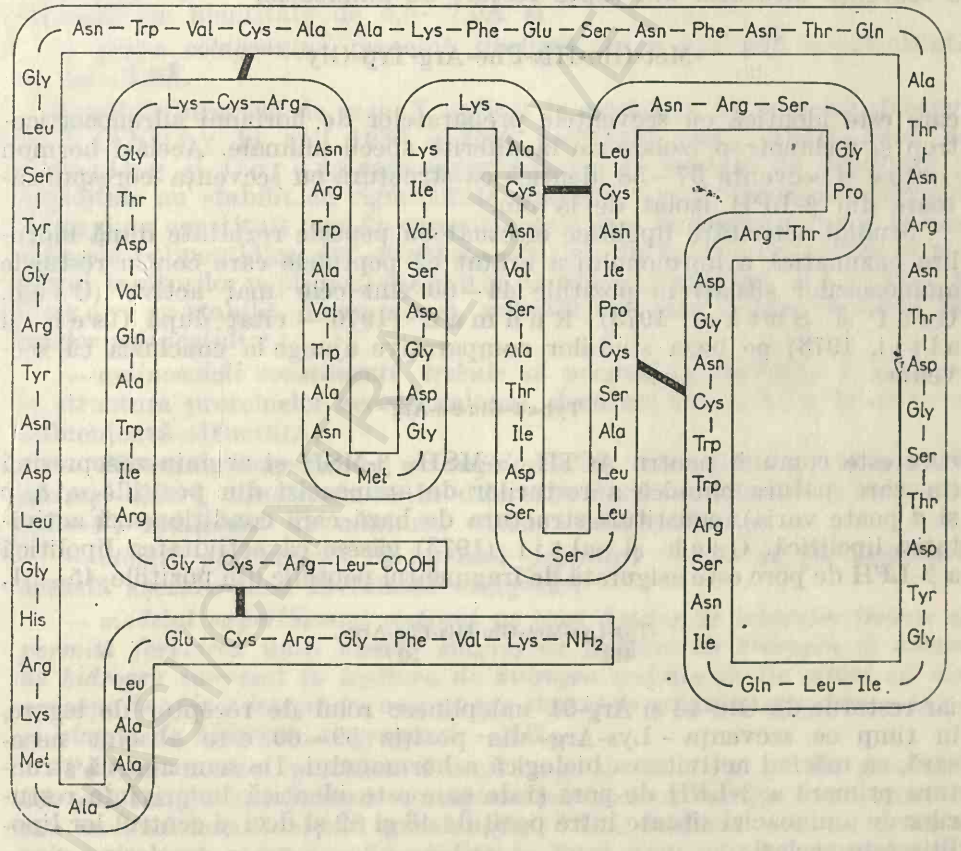
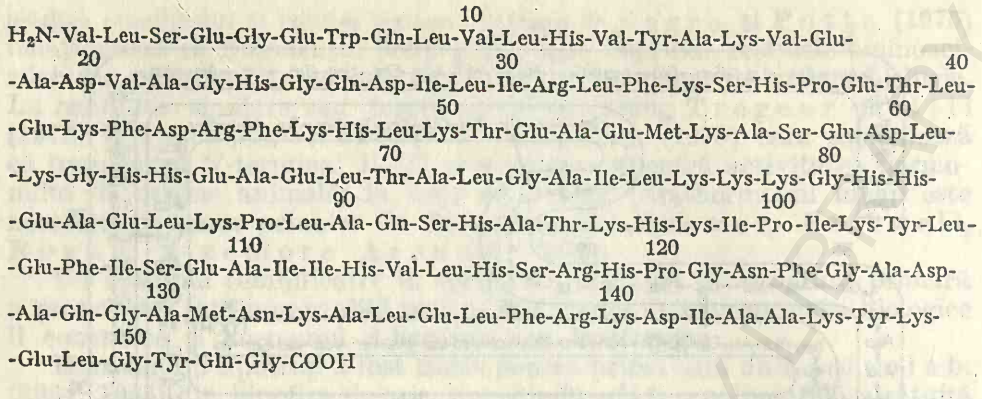


Fig. 113, b



c

Fig. 3.13 — Structura primară a ribonucleazei (*a*), muramidazei (lizozim) (*b*) și mioglobinei (*c*)

Li, Barnafi, Chretien și Chung (1965) semnalează și faptul că hormonul β-LPH izolat din glanda hipofiză de la oaie conține o secvență alcătuită din șapte resturi de aminoacizi

-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-

care este identică cu secvențele preparatelor de hormoni adrenocorticotrop și melanotrop izolate de la diferite specii animale. Același hormon conține și secvența 37—58 identică ca structură cu secvența corespunzătoare din β-LPH izolat de la om.

Studiul activității lipolitice efectuat cu peptide rezultate după hidroliza enzimatică a hormonului a arătat că peptidele care conțin resturile aminoacizilor situați în pozițiile 44—60 sînt cele mai active (Cseh, Graf și Sutka, 1973). Rudman (1970 — citat după Cseh și alții, 1973) pe baza studiilor comparative ajunge la concluzia că secvența

Tyr-*a*-*b*-Glu-*c*-*d*-Arg

care este comună pentru ACTH, α-MSH, β-MSH și arginin-vasopresină (în care natura chimică a resturilor de aminoacizi din pozițiile *a*, *b*, *c* și *d* poate varia), constituie structura de bază care condiționează activitatea lipolitică. Cseh și alții (1973) găsesc că activitatea lipolitică a β-LPH de porc este asigurată de fragmentul peptidic din pozițiile 45—51,

-Tyr-Lys-Met-Glu-His-Phe-Arg-...
45 50

iar resturile de Glu-48 și Arg-51 îndeplinesc rolul de receptor de legare, în timp ce secvența - Lys-Arg- din poziția 59—60 este absolut necesară, ea mărind activitatea biologică a hormonului. De semnalat că structura primară a β-LPH de porc și de oaie este identică în privința resturilor de aminoacizi situate între pozițiile 43 și 82 și deci și centrul lor lipolitic este același.

În figura 3.13 este redată structura primară a moleculei ribonucleazei din pancreasul de bovine (Smyth, Moore și Stein, 1963), confirmată prin sinteză în laborator de Hirschmann și alții (1969) precum și structura primară a muramidazei (Phillips și alții, 1965) și a mioglobinei.

3.3.2 Structura secundară a proteinelor

Folosirea *metodei difracției razelor X în studiul scleroproteinelor a evidențiat că* proteinele fibrilare se caracterizează prin *prezența unor regularități structurale ale moleculei*, prin *unități care se repetă, dispuse de-a lungul unui ax imaginar al moleculei*, cu dimensiunea de 5 pînă la 5,5Å. Aceste regularități în structura moleculei au fost numite *perioade de identitate* și ele *diferă de la o proteină la alta.* De exemplu, proteinele în funcție de perioadele lor de identitate se pot împărți în trei grupe :

— *grupa α-keratinei, miozinei și fibrinogenului*, cu o perioadă de identitate de 5,1—5,4Å ;

— *grupa β-keratinei și a fibroinei din mătasea de Bombyx mori*, cu o perioadă de identitate de 6,5—7,0Å și

— *grupa colagenului*, proteină fibrilară, cu o perioadă de identitate de 2,8—2,9Å.

Studiul difracției de raze X aplicat la cristalele de proteine, început de Astbury în anii 1930 a fost continuat după 1939—1940 de Pauling și Corey, care experimentînd pe cristale de dipeptide și tripeptide au stabilit cu rigurozitate condițiile formării catenelor polipeptidice și au constituit modele experimentale care să ilustreze modul în care catenele polipeptidice sînt orientate spațial, în funcție de natura și numărul legăturilor peptidice, precum și de dimensiunile lor. Pauling și Corey au stabilit, de asemenea, *criteriile care stau la baza formării catenelor polipeptidice* :

— *aminoacizii constituenți trebuie să prezinte configurația L* și ei au în structura proteinelor aceeași valoare, deoarece catenele lor laterale nu influențează structura ;

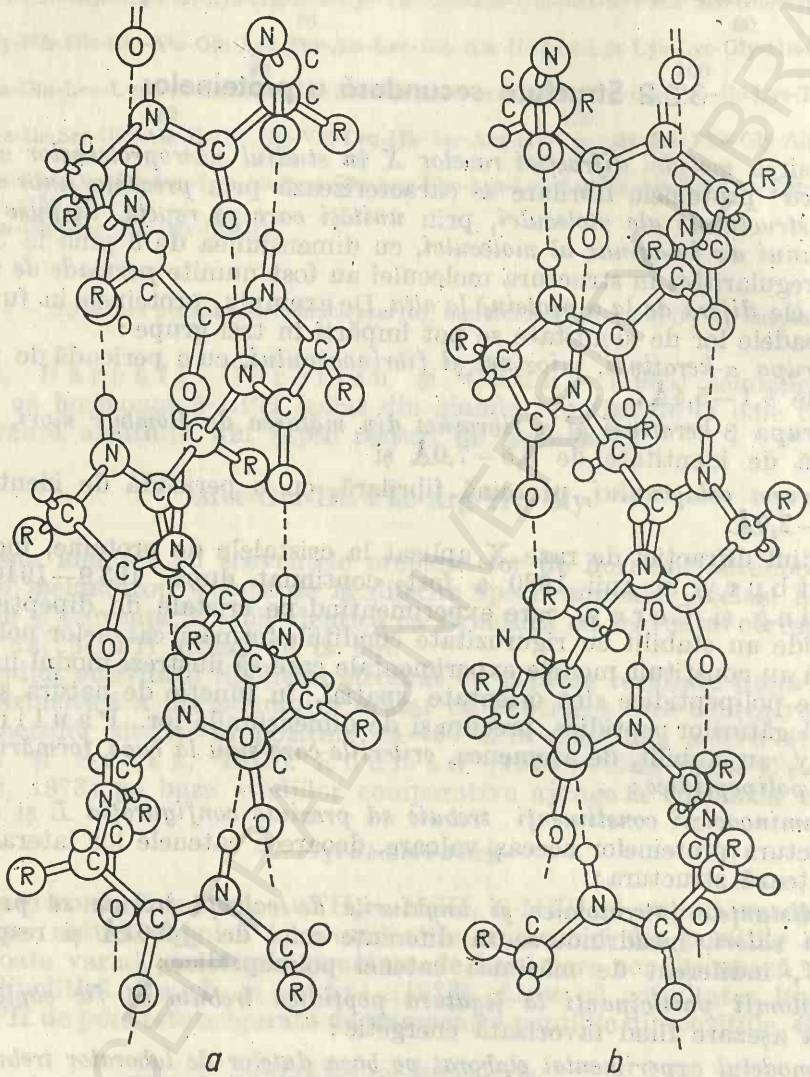
— *distanțele interatomice și unghiurile de valență trebuie să prezinte aceleași valori*, încadrîndu-se în diferențe mici de $\pm 0{,}01$Å și respectiv ± 3—$4°$, indiferent de mărimea catenei polipeptidice ;

— *atomii participanți la legătura peptidică trebuie să fie coplanari*, această așezare fiind favorizată energetic ;

— *modelul experimental elaborat pe baza datelor de laborator trebuie să permită formarea unui număr maxim de legături de hidrogen* și *atomul de hidrogen interesat în legătura de hidrogen* trebuie să fie *situat cît mai aproape de o linie imaginară care unește atomul de oxigen al grupării* —CO— *și atomul de hidrogen al grupării* —NH—.

Pe baza acestor postulate Pauling și Corey (1952) găsesc că cel mai simplu aranjament, corespunzător acestor cerințe este structura sau modelul helicoidal sau spiralat (fig. 3.14), denumit *α-helix*, rezultat prin spiralarea catenei polipeptidice în jurul unui cilindru imaginar. În

funcție de direcția de spiralare teoretic α-helixul poate să apară sub două forme : *α-helixul de dreapta*, care are sensul unui șurub cu pasul spre dreapta și *α-helixul de stînga*, care are sensul unui șurub cu pasul spre stînga (figura *a* și *b*). Catenele laterale ale resturilor de aminoacizi ies în afara



a *b*

Fig. 3.14 — Modelele de α-helix :
a — spre dreapta și *b* — spre stînga (după Pauling și Corey, 1954).

corpului propriu-zis al α-helixului și pot interacționa între ele sau cu solventul în care este solvită proteina. Un singur rest de aminoacid, din cei 20—22 de aminoacizi întîlniți frecvent în proteine, nu se încadrează perfect în α-helix și anume prolina, care determină o deranjare a structurii perfect regulate a α-helixului. Structura helicoidală a macromolecu-

lelor proteice a fost postulată de biochimistul român Haralamb Vasiliu, cu 16 ani înaintea lui Pauling și Corey (Buruiană, 1970).

Cele două tipuri de α-helix sînt alcătuite, conform postulatului, din resturi de aminoacizi ce aparțin seriei *L*, diferența dintre ele rezumîndu-se la orientarea catenelor laterale R, situate la nivelul atomului de C din poziția α a restului aminoacidului, față de atomul de oxigen al grupării carbonil: în α-helixul de dreapta R se află în poziția *trans* față de oxigen, iar în α-helixul de stînga în poziția *cis* (fig. 3.14). α-Helixul se poate forma însă și din resturi de *D*-aminoacizi, dar nu se pot alcătui modele moleculare care să corespundă postulatelor formulate și care să fie alcătuite din resturi de *L*- și de *D*-aminoacizi. Din cele două forme de helix, α-helixul de dreapta s-a dovedit a fi cel mai stabil și totodată răspîndit în structura proteinelor fibrilare native studiate pînă în prezent. *α-Helixul are forma unei scări în spirală, unde fiecărei trepte a scării imaginare îi corespunde un rest de aminoacid; înălțimea unei trepte* rezultată din proiecția ei pe axa imaginară a cilindrului în jurul căruia se rotește catena polipeptidică, *este de 1,5Å, iar unei spire complete îi corespund 3,6 resturi de aminoacizi și o perioadă de identitate de aproximativ 5,44Å*, adică 3,6 × × 1,5Å. Conform postulatului atomii participanți la formarea legăturii peptidice sînt coplanari și deci rotația liberă necesară spiralării catenei, înfășurării ei în jurul cilindrului imaginar, se poate realiza numai în jurul atomului α al restului de aminoacid, ceea ce duce la formarea unui unghi de 80° între două planuri învecinate ale spiralei (fig. 3.15). Ca urmare a acestor rotiri rezultă formarea unui α-helix de dreapta dintr-o catenă liniară, atunci cînd legăturile peptidice rămîn așezate în paralel cu axul α-helixului (fig. 3.16).

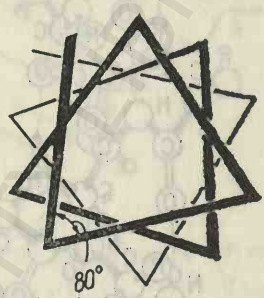


Fig. 3.15 — Rotirea catenei polipeptidice în jurul atomilor de carbon α cu un unghi de 80° și suprapunerea în spațiu a diferitelor planuri.

Această așezare spațială care conferă moleculei o arhitectonică structurală este *menținută datorită legăturilor de hidrogen intracatenare*, la care participă toate grupările —NH— și —CO— și se formează aproape perfect paralel axei imaginare a α-helixului (fig. 3.14). *Modelul α-helicoidal permite formarea unui număr maxim de legături de hidrogen*, acestea formîndu-se între —CO— a unui rest de aminoacid și gruparea —NH— a altui rest de aminoacid situat la o distanță de trei resturi de aminoacizi (trei secvențe) față de primul.

După un interval al α-helixului care cuprinde 18 resturi de aminoacizi α-helixul este superpozabil, adică se *repetă identic*, după fiecare 5 spire (18 : 3,6 resturi ale unei trepte = 5 spire). Proiecția acestui interval pe axa spiralei este de aproximativ de 27 Å (18 × 1,5) și formează *perioada mare de identitate* a α-helixului (fig. 3.17).

Structura α-helicoidală a proteinelor native constituie un *nivel de organizare* al acestora denumit și *structură secundară*. Trebuie însă să se țină seama că *toate proteinele* cercetate nu *prezintă o structură secundară total sau perfect spiralată*. Cele mai multe proteine *prezintă o organizare struc-*

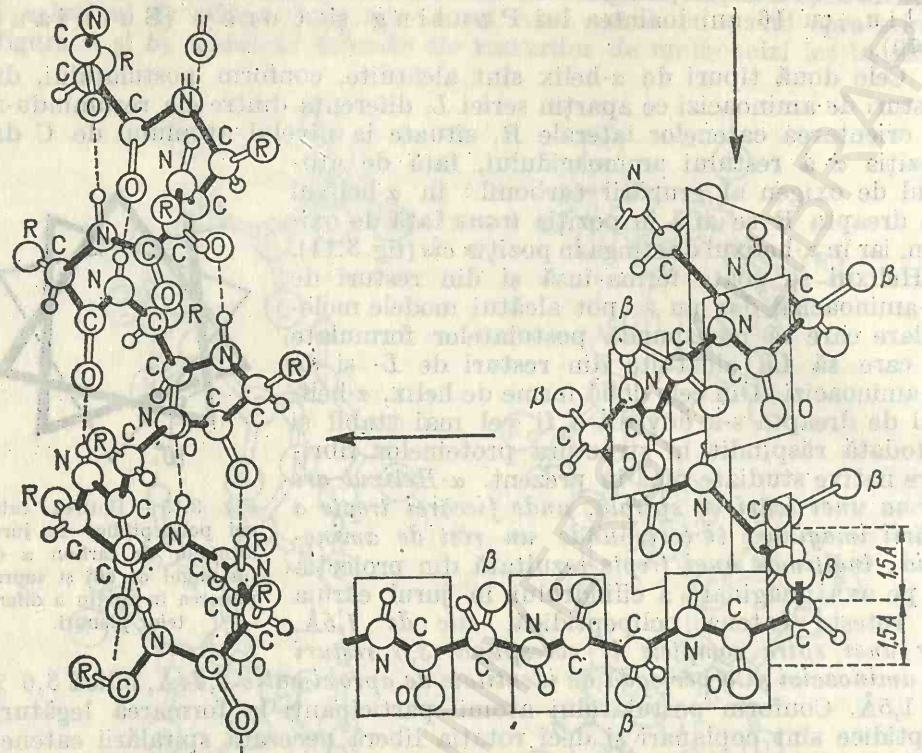


Fig. 3.16 — Modalitatea de formare a unui α-helix într-o catenă polipeptidică liniară

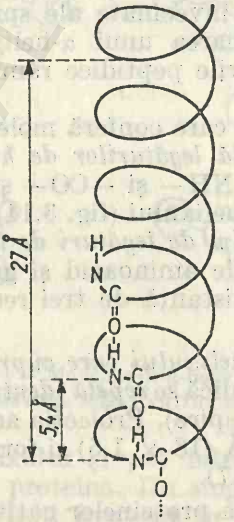


Fig. 3.17 — Reprezentarea schematică a unui α-helix din care reiese perioada mare de identitate corespunzătoare la aproximativ cinci spire.

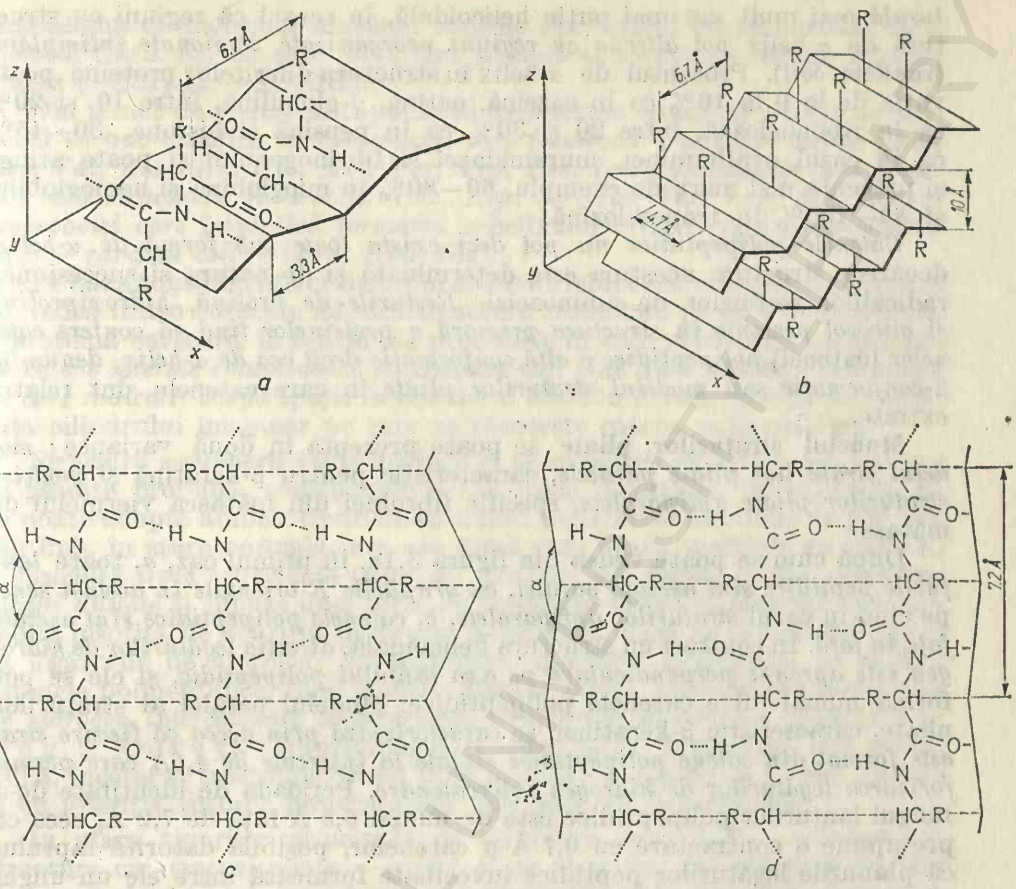


Fig. 3.18 — Schema modelului straturilor pliate specifice keratinei :
a și *c* — catenă polipeptidică pliată paralel, *b* și *d* — catenă polipeptidică pliată antiparalel.

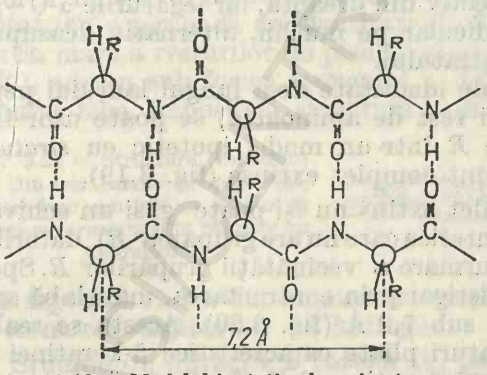


Fig. 3.19 — Modelul ipotetic al unei catene polipeptidice cu straturi pliate complet extinse

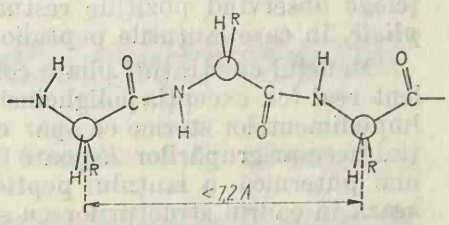


Fig. 3.20 — Situarea în spațiu a radicalilor *R* într-o catenă polipeptidică cu straturi pliate. „Contractarea" radicalilor catenei polipeptidice are drept urmare asigurarea spațiului necesar plierii

turală mai mult sau mai puțin helicoidală, în sensul că regiuni cu structură de α-helix *pot alterna cu regiuni neorganizate, torsionate întîmplător* (*random coil*). Procentul de α-helix în structura diferitelor proteine poate varia de la 0 la 10% ca în cazeină, actină, γ-globulină, între 10 și 20% ca în ribonuclează, între 20 și 30% ca în pepsină și histone, 30—45% ca în cazul ovalbuminei, muramidazei și fibrinogenului și poate atinge și procente mai mari, de exemplu, 60—80% în mioglobină și hemoglobină și 80—100% în tropomiozină.

Catenele polipeptidice nu pot deci exista toate sub formă de α-helix, deoarece structura acestuia este determinată și de natura și succesiunea radicalilor resturilor de aminoacizi. *Resturile de prolină, hidroxiprolină și glicocol prezente în structura primară a proteinelor tind să confere catenelor* (catenei) *polipeptidice o altă conformație decît cea de α-helix, denumită β-conformație* sau *modelul straturilor pliate* în care catenele sînt relativ extinse.

Modelul straturilor pliate se poate prezenta în două variante: *modelul straturilor pliate paralele*, caracteristic pentru β-keratină și *modelul straturilor pliate antiparalele*, specific fibroinei din mătasea viermelui de mătase.

După cum se poate vedea din figura 3.18, în primul caz, *a*, toate *lanțurile peptidice sînt așezate paralel, cu grupările R orientate în același sens*, pe cînd în cazul *straturilor antiparalele, b, catenele polipeptidice sînt așezate față în față*. În contrast cu structura helicoidală, *direcția legăturilor de hidrogen este aproape perpendiculară pe axa lanțului polipeptidic*, și ele se pot forma numai între catenele polipeptidice. Modelul paralel al straturilor pliate, caracteristic β-keratinei, se *caracterizează prin aceea că fiecare strat este format din catene polipeptidice situate la intervale de 4,6Å care permit formarea legăturilor de hidrogen intercatenare*. Perioada de identitate de-a lungul lanțurilor polipeptidice este de numai 6,5 Å față de 7,2 Å, ceea ce presupune o contractare cu 0,7 Å a catenelor, posibilă datorită faptului că planurile legăturilor peptidice învecinate formează între ele un unghi (fig. 3.18). Atomii de C din poziția α a aminoacizilor sînt situați pe muchia care desparte cele două planuri, valențele α-C—CO— și α-C—NH— fiind situate în planurile din stînga, respectiv din dreapta, iar legăturile α-C—R și α-C—H situate aproape perpendicular pe muchii, alternativ deasupra și dedesubtul planului general al stratului.

Necesitatea scurtării perioadei de identitate de-a lungul lanțului peptidic (de fapt contractarea fiecărui rest de aminoacid) se poate ușor înțelege observînd pozițiile resturile *R* într-un model ipotetic cu *straturi pliate*, în care lanțurile peptidice sînt complet extinse (fig. 3.19).

Modelul cu straturi pliate complet extins nu își poate găsi un echivalent real (cu excepția poliglicinei sintetice care nu are gruparea *R*) datorită impedimentelor sterice ce apar ca urmare a vecinătății grupărilor *R*. Spațiul necesar grupărilor *R* poate fi cîștigat prin contractarea, mai slabă sau mai puternică, a lanțului peptidic sub 7,2 Å (fig. 3.20). Acesta se realizează în cadrul structurilor cu straturi pliate caracteristice β-keratinei și fibroinei. În cazul fibroinei cu structură antiparalelă (fig. 3.18, *d*), a straturilor pliate lungimea unei unități a aminoacidului din catena polipeptidică are valoarea de 7 Å, reprezentînd deci o contracție mai mică (abia 0,2 Å) decît în cazul β-keratinei (0,7 Å). Faptul este perfect explicabil dacă se

ține seama că molecula fibroinei conține din totalul de aminoacizi 46% glicocol (fără *R*), iar alte 38% sînt alanină și serină cu catene laterale scurte ($-CH_3$ și $-CH_2OH$).

Din punct de vedere al capacității de a forma structuri α-helix aminoacizii se pot clasifica în *aminoacizi care formează α-helixuri stabile* (*Ala, Cys, Val, Asn, Gln, His, Met, Tyr, Trp, Phe, Leu*), *aminoacizi care destabilizează structurile în α-helix* (*Glu, Asp, Ser, Ile, Thr, Lys, Arg, Gly*) și *aminoacizi care împiedică formarea* α-helixului creind regiuni dezorganizate — *random coil* — (*Pro, Hyp, Gly*).

Pe baza considerentelor de ordin steric de felul celor de mai sus, se poate prevedea într-o oarecare măsură structura secundară pe care o va adopta o proteină oarecare, în sensul că, proteinele în care predomină *aminoacizi cu catene laterale voluminoase se pretează mai bine unei structuri helicoidale în care radicalii ocupă spații în exteriorul elicei* în diverse poziții pe suprafața cilindrului imaginar pe care se răsucește catena polipeptidică.

Structura secundară poate depinde și de condițiile experimentale în care se găsește proteina, constatîndu-se în cazul keratinei, de exemplu, că ea poate adopta ambele tipuri de structuri. *α-Keratina* din firele de păr sau din lînă, în stare normală, are așa după cum arată spectrele de raze X, o *structură tipic helicoidală* (*elice* α). *Aceleași fire tratate cu apă caldă sau alcalii diluate* și supuse unei forțe de tracțiune suferă o alungire considerabilă însoțită de apariția *spectrului β-keratinei*, ceea ce dovedește faptul că legăturile de hidrogen intracatenare specifice α-helixului se desfac, catenele polipeptidice, fiind grupate paralel odată cu *refacerea legăturilor de hidrogen intercatenare caracteristice structurilor cu straturi pliate* (P a u l i n g și C o r e y). Transformarea α-keratinei în β-keratină este reversibilă, încetarea tracțiunii firului fiind soldată cu refacerea formei inițiale și cu apariția tuturor proprietăților spectrale ale α-keratinei.

În afara tipurilor principale de structură secundară — α-helixul și structura cu straturi pliate — există și un al treilea tip denumit *modelul structural al colagenului*, proteină mult răspîndită în țesuturile conjunctive, tendoane, ligamente, cartilagii, piele, oase etc. Studiile de difracție a razelor *X* indică un model structural diferit de cel α-helicoidal și de cel stratificat, cu o perioadă de identitate de 2,86 Å, paralelă cu axa fibrei. Proporția mare a resturilor de prolină și hidroxiprolină (pînă la 1/4 din moleculă), adesea sub forma secvenței ..-Gly-Pro-Hyp-.. din molecula colagenului face imposibilă structura α-helicoidală sau β-stratificată, dato-

Fig. 3.21 — Structura colagenului. Din trei catene polipeptidice, fiecare reprezentînd un α-helix de stînga se formează prin răsucire un suprahelix

rită faptului că cei doi aminoacizi inserați în structură nu pot participa la formarea legăturilor de hidrogen.

Studiile de difracție a razelor *X*, pe cristale de colagen, au arătat că acesta este alcătuit din trei catene polipeptidice, răsucite una în jurul celeilalte și toate trei în jurul unei axe proprii, dînd naștere unui *triplu helix* (fig. 3.21). Resturile de *Pro* și *Hyp* sînt distanțate între ele prin resturi de *Gly* și împiedică formarea legăturilor de hidrogen intracatenare. Fiecare

catenă polipeptidică a colagenului are o masă moleculară de 95 000 daltoni și este alcătuită din aproximativ 1 000 resturi de aminoacizi. Trei astfel de *suprahelixuri* sînt strîns legate între ele prin *legături de hidrogen intercatenare* dînd naștere *tropocolagenului*.

3.3.3 Structura terțiară a proteinelor

Acest nivel de organizare structurală reprezintă rezultatul interacțiunilor dintre resturile aminoacizilor din catenele polipeptidice (R), interacțiuni care apar deja și în cazul lanțurilor polipeptidice mai lungi care au o structură secundară proprie. P a u l i n g a sugerat că fiecare elice poate fi la rîndul ei înfășurată sub forma unei *supraelici* (superhelix) ce posedă o *spiră mare* pentru fiecare 35 de spire a elicei α. Șase astfel de suprahelixuri sînt împletite în jurul unui al șaptelea spre a forma *o arhitectură moleculară complexă asemănătoare unei funii formate din șapte fire torsionate* (fig. 3.22).

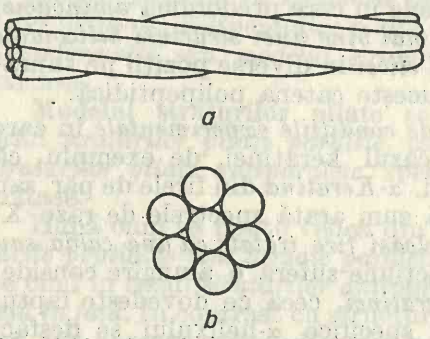


Fig. 3.22 — Modelul unei structuri terțiare (după F r e y-W y s s l i n g și M u h l e t h a l e r):
a — vedere din profil; *b* — secțiune transversală.

Proteinele cu o *structură terțiară bine studiată* și cunoscută în prezent sînt hemoglobina, mioglobina, muramidaza, ribonucleaza, papaina, chimotripsinogenul, carboxipeptidaza *A*, subtilizina.

Menținerea structurii terțiare se realizează prin forțele de atracție care se nasc între radicalii catenelor polipeptidice ce pot ajunge în poziții favorabile formării unor legături.

— **Legături de hidrogen** care se pot forma între gruparea fenolică a tirozinei și un rest carboxilic, aparținînd acidului glutamic sau acidului aspartic, între restul imidazolic al histidinei și gruparea —OH a serinei etc. (nu însă între —CO— și —NH ale legăturilor peptidice, deoarece acestea aparțin structurii secundare).

— **Legături ionice** între resturile —COOH ale aminoacizilor dicarboxilici și resturile —NH_2 ale acizilor diaminomonocarboxilici. Aceste legături se realizează cînd distanța dintre atomi e cuprinsă între 2 și 3,1 Å. Studii ale difracției razelor *X* au demonstrat că doar o parte relativ mică dintre legăturile ionice posibile se realizează în realitate, datorită faptului că majoritatea lor intră în interacțiune cu solventul. O concluzie derivată din această observație este aceea că *proteinele au în soluții o conformație în care un număr maxim de grupări polare sînt expuse la suprafața arhitecturii moleculare*, deci interacționează ușor cu solventul, iar resturile aminoacizilor cu grupări nepolare sînt dispuse în interiorul acesteia.

— **Legături apolare prin forțe van der Waals** formate între resturile de hidrocarburi ale catenelor laterale (alanină, fenilalanină, leucină etc.). La aceste legături, care s-au dovedit de o deosebită însemnătate pentru menținerea structurii terțiare, participă atomi care se află la distanțe variind între 3,1 și 4,1 Å.

Aceste tipuri de legături (fig. 3.23) implicate în structura terțiară a moleculelor proteice sînt mult mai labile decît legăturile chimice obișnuite (tabelul 3.5).

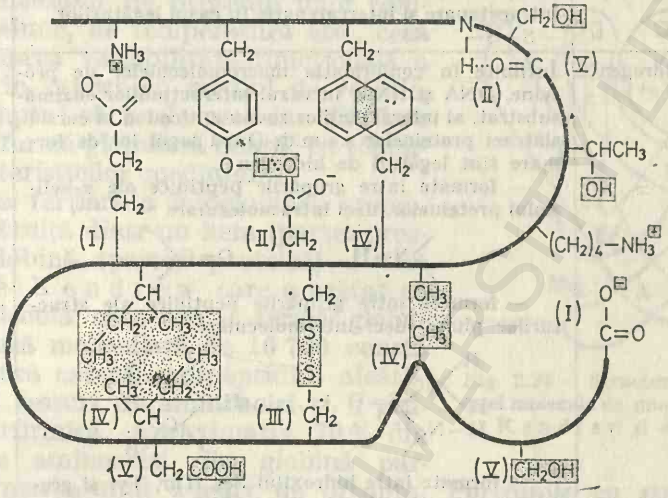


Fig. 3.23 — Tipurile de legături implicate în apariția și menținerea structurii terțiare a macromoleculelor proteice:

(I) legătură ionică; (II) punte de hidrogen; (III) punte disulfurică; (IV) forțe van der Waals; (V) grupări libere capabile să ionizeze, să participe la formarea unor legături sau să fie esterificate.

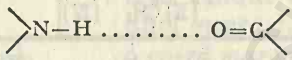
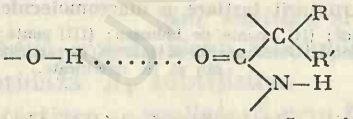
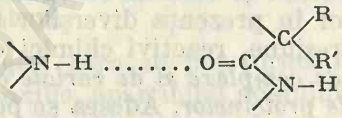
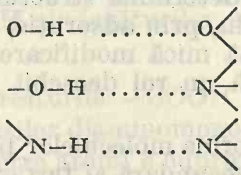
Diversitatea tipurilor de legături chimice întîlnite în structurile terțiare ale biopolimerilor, precum și valorile energiilor legăturilor explică marea labilitate a proteinelor în prezența diverșilor factori externi sau celulari (*p*H, temperatură, presiune, reactivi chimici etc.). *Dezorganizarea acestei structuri terțiare atît de complexe și de variate aduce cu sine pierderea proprietăților biologice ale proteinelor.* Adesea se pot produce doar mici modificări în conformația ce determină structura terțiară prin legarea într-un mod oarecare, de exemplu, prin adsorbție, a unui compus chimic cu masa moleculară mică. Această mică modificare a conformației poartă numele de *efect alosteric* și joacă un rol deosebit în activitatea enzimelor (capitolul 20).

În ceea ce privește forma moleculelor proteice, care este condiționată îndeosebi de structura secundară și terțiară, se cunosc ca tipuri extreme *proteine fibrilare și proteine globulare*, alături de numeroase proteine care au o structură intermediară.

Proteinele fibrilare au structură filiformă alcătuită din catene liniare; majoritatea îndeplinesc în organism mai ales rol de susținere și rezistență mecanică. Reprezentanții tipici ai acestei categorii de proteine sînt miozina, keratina din păr, fibroina din mătase etc.

TABELUL 3.5

Legăturile chimice întîlnite în structura proteinelor, rolul în molecule și energia lor aproximativă, exprimată în kcal/mol.

Tipul de legătură chimică	*Rolul legăturii în biomolecule*	*Energia aproximativă* (kcal/mol)
Legături covalente C—C; C—N; C—S; S—S	Se întîlnesc în structura primară a macromoleculelor, în structura secundară unde formează punți intracatenare și intercatenare, în cazul legăturilor —S—S—	30—100
Legături de hidrogen	Întîlnite în conformația macromoleculelor de proteine, DNA și RNA, în cazul interacțiunilor enzimă-substrat, al interacțiunilor codon-anticodon în cursul sintezei proteinelor ș.a.m.d. După locul lor de formare sînt legături de hidrogen :	
	— formate între grupările peptidice ale α-helixului proteinelor, deci intramoleculare 	2—3
	— formate între grupările peptidice ale structurilor pliate, deci intermoleculare	2—3
	— formate între hidroxilul Ser, Thr, Tyr și gruparea carbonil a legăturii peptidice 	6
	— formate între amino gruparea Lys și Arg gruparea carbonil a legăturii peptidice 	2—3
	— alte legături de hidrogen : 	6 7 2—4
Legături ionice	Forțe de atracție între bazele azotate ale acizilor nucleici ; în structura secundară și terțiară a macromoleculelor, în interacțiunile dintre enzimă și substrat	10—20
Legături van der Waals	Forțe de atracție între bazele azotate ale acizilor nucleici ; în structura secundară și terțiară a biopolimerilor ; în interacțiunile enzimă-substrat	Energia variabilă ($1/r^6$)
Legături-coordinative	În unele cromoproteine și în metaloenzime	4—5

Proteinele globulare nu au formă sferică, ci forma unor cilindri elipsoidali a căror lungime depăşeşte de 2—6 ori diametrul lor şi în care catenele macromoleculare sînt strînse sub formă de ghem. Se găsesc în general în lichidele din organism (albumine, globuline).

Forma moleculelor proteice se datoreşte nu numai factorilor care aparţin de însăşi structura moleculelor, ci şi factorilor de mediu. Replierea, bobinarea, desfacerea catenelor depinde de *p*H şi salinitatea mediului, de prezenţa unor compuşi, de presiune, de temperatură etc., ceea ce explică marea variabilitate funcţională a proteinelor în raport cu mediul de reacţie, precum şi faptul că unele proteine fibrilare pot adopta formă globulară odată cu schimbarea caracteristicilor mediului.

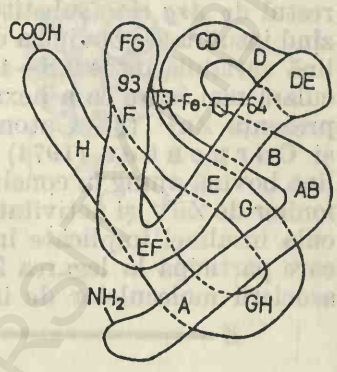


Fig. 3.24 — Structura terţiară a unei molecule de mioglobină (după K e n d r e w şi alţii, 1970)

Structura terţiară a mioglobinei, cromoproteidă alcătuită dintr-un hem (partea prostetică) şi globină (partea proteică) a fost elucidată de K e n d r e w care a arătat că această moleculă care are o formă globulară şi o masă moleculară de 16 700 constă dintr-o singură catenă polipeptidică alcătuită din 153 resturi de aminoacizi şi o grupare feroporfirinică. Aproximativ 70% din resturile de aminoacizi din globină participă la formarea unui α-helix de dreapta. Porţiunile cu structură de α-helix în număr de opt alternează cu porţiuni dezorganizate în număr de cinci care creează posibilitatea unor inflexiuni ale catenei polipeptidice. Molecula mioglobinei este compactă şi în interiorul ei se află un spaţiu în care se găsesc numai patru molecule de apă, iar grupările R ale resturilor de aminoacizi sînt orientate către exteriorul moleculei şi sînt hidratate în timp ce grupările R apolare sau hidrofobe sînt îndreptate spre interiorul moleculei. Două resturi de *His* situate în poziţiile 64 şi 93 ale catenei polipeptidice participă la legarea atomului de Fe al hemului, în timp ce resturile de *Pro, Ser, Ile* condiţionează inflexiunile catenei (fig. 3.24).

3.3.4 Structura cuaternară a proteinelor

Reprezintă *nivelul de organizare cel mai înalt al proteinelor* şi este *rezultatul interacţiunii dintre catenele polipeptidice* independente *care au structuri primare, secundare şi terţiare bine definite.* Acest tip de structură este frecvent pentru proteinele globulare a căror masă moleculară este mai mare de 50 000 şi deci sînt *proteine oligomere* alcătuite din *protomeri.*

Pentru început va fi dat un exemplu din care reiese rolul diferiţilor parametri fizico-chimici în formarea structurii cuaternare care reprezintă un fel de superedificiu molecular. *Structura secundară* a insulinei, cel puţin pentru o parte din moleculă, este α-helix; *structura terţiară* este necunoscută, iar *structura cuaternară* care rezultă prin polimerizare şi este în funcţie de *p*H, temperatură, de concentraţia insulinei în mediu şi de prezenţa

Zn^{2+} reprezintă un tetramer cu o masă moleculară de aproximativ 24 000 și o constantă de sedimentare de $1{,}95 \times 10^{13}$. Insulina cristalizată poate exista sub formă de dimeri sau hexameri, însă uneori este prezentă exclusiv sub formă de monomer, cu o masă moleculară de 5 320 (Zimmerman, Yip, 1974), de exemplu, în cazul insulinei de cobai care în prezența Zn^{2+} nu dimerizează. Zimmerman și Yip (1974) consideră că lipsa posibilității de a dimeriza este legată de faptul că în poziția B_{22} restul de *Arg* este substituit cu un rest de *Asp*. Jeffrey (1974) utilizînd insulina de bovine a demonstrat că la *p*H 7 și o concentrație de insulină variabilă între 0,8—4 mg/ml, se pot obține polimeri cu o masă moleculară mai mare ca a hexamerului insulinei ce se formează desigur tot în prezența Zn^{2+} (3—4 atomi-gram de Zn^{2+} la un hexamer). Goldman și Carpenter (1974) studiind dinamica legării zincului de către insulina bovină ajung la concluzia că nu există o legătură directă între legarea ionilor de Zn^{2+} și activitatea hormonală a insulinei (?) și părțile din molecula insulinei implicate în activitatea ei biologică sînt deosebite de cele care participă la legarea Zn^{2+}. În figura 3.25 se redă schematic procesul asocierii moleculelor de insulină prin intermediul ionilor de Zn^{2+}.

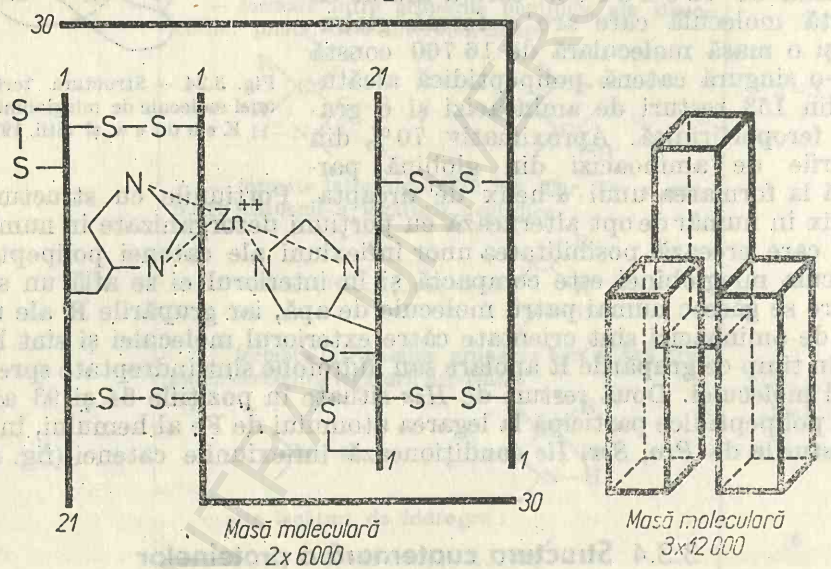


Fig. 3.25 — Asocierea moleculelor de insulină cu formare de agregate moleculare cu mase diferite

Asocierea moleculelor de insulină cu formare de trimeri și tetrameri are și o importanță practică deoarece preparatele de insulină utilizate pentru tratamentul diabetului diferă după compoziția lor chimică și timpul de acțiune:

— *insulina obișnuită sau clasică* este un preparat de insulină cristalizată cu o acțiune rapidă (după primele 20—30 minute) și cu o durată maximă de acțiune de aproximativ șase ore;

— *zincglobininsulina* preparat cu o acțiune mai lentă (după primele 1—1 1/2 ore) cu un maximum de efect după 6—8 ore și o durată de acțiune de circa 14—16 ore;

— *insulina NPH* este un preparat de insulină a cărei acțiune se declanșează după 3 1/2—4 ore după administrare și rămîne activă influențînd glicemia timp de 22—24 ore;

— *zincprotamininsulina* preparat cu acțiune lentă (după 5—6 ore de la injectare) și cu influență prelungită asupra glicemiei (pînă la 30—32 ore). Modul ei de acțiune se datorește faptului că este lent resorbită, prezentînd

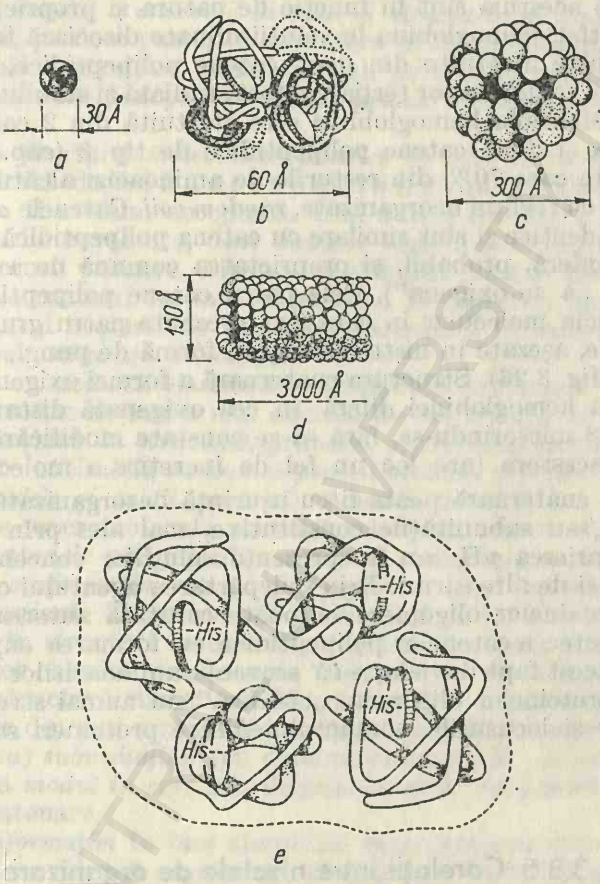


Fig. 3.26 — Structura cuaternară a unor proteine și dimensiunile lor redate în Å:
a — mioglobina; *b* — hemoglobina; *c* — polio-virusul; *d* — virusul mozaicului tutunului; *e* — structura lanțurilor α și β din hemoglobină.

astfel avantajul de a suplini oarecum secreția de insulină a pancreasului. Preparatele de insulină se administrează de obicei pe cale subcutanată și dozele variază în funcție de gravitatea diabetului, de vîrstă, de gradul de echilibrare a metabolismului glucidic și de unele stări fiziologice deosebite (intervenții chirurgicale, infecții, accidente etc.).

Proteinele oligomere pot avea o ierarhie complexă a subunităților din care sînt alcătuite. De exemplu, glutamat dehidrogenaza ficatului de bovine este alcătuită din opt subunități egale, fiecare avînd o masă mole-

cular de 280 000. Fiecare subunitate este constituită la rîndul ei din catene polipeptidice, masa moleculară a unei catene fiind egală cu ~50 000. În asemenea cazuri noţiunea de *protomer* se utilizează pentru a desemna catenele polipeptidice, iar pentru unitatea funcţională (care poate avea activitate catalitică în cazul enzimelor sau activitate hormonală) se foloseşte termenul de *subunitate*. Numărul subunităţilor dintr-o proteină oligomeră poate varia în limite foarte largi (v. tabelul 3.3) şi modalităţile de stabilire a acestuia sînt în funcţie de natura şi proprietăţile proteinei analizate. Astfel, hemoglobina în soluţii diluate disociază în două subunităţi α, β fiecare alcătuite din două catene polipeptidice, una de tip α, alta de tip β şi structura lor terţiară a fost studiată şi stabilită de P e r u t z şi c o l a b. Molecula hemoglobinei este alcătuită din 2 catene polipeptidice de tip α şi două catene polipeptidice de tip β (cap. 4), care au o conformaţie în care 70% din resturile de aminoacizi alcătuiesc un α-helix ce alternează cu regiuni neorganizate, *random coil*. Catenele α şi β au structuri terţiare identice şi sînt similare cu catena polipeptidică a mioglobinei, ceea ce le conferă, probabil, şi proprietatea comună de a lega reversibil oxigenul (de „a se oxigena"). Cele patru catene polipeptidice alcătuiesc un superedificiu molecular în care sînt prezente patru grupări prostetice feroporfirinice, aşezate în nişte cavităţi în formă de pungi, uşor accesibile din exterior (fig. 3.26). Structura cuaternară a formei oxigenate şi a formei neoxigenate a hemoglobinei diferă, în cea oxigenată distanţa dintre cele două catene β micşorîndu-se, fără să se constate modificări ale structurii terţiare ale acestora (are loc un fel de încreţire a moleculei).

Structura cuaternară poate fi cu uşurinţă dezorganizată, obţinîndu-se protomerii şi/sau subunităţile constitutive, mai ales prin diluarea soluţiilor, prin varierea *p*H sau în prezenţa soluţiilor concentrate de uree, de guanidină şi de alte săruri. Prin îndepărtarea agentului care determină disocierea proteinelor oligomere se poate constata autoreasamblarea rapidă din amestec a catenelor polipeptidice cu formarea suprastructurilor moleculare. Acest fapt dovedeşte că secvenţa aminoacizilor în catena polipeptidică a proteinelor oligomere „codifică" nu numai structura terţiară a catenei dar şi locusurile contactului dintre protomeri sau dintre subunităţi.

3.3.5 Corelaţii între nivelele de organizare ale structurii proteinelor

Nivelele superioare de organizare a structurii proteinelor native sînt specifice şi întotdeauna aceleaşi pentru o proteină oarecare în condiţii naturale. Structurile secundare, terţiare şi cuaternare sînt condiţionate, în ultimă instanţă *de structura primară*, aşa după cum arată experimentele privind refacerea structurii terţiare a ribonucleazei. Într-adevăr, *reducerea legăturilor disulfurice din molecula ribonucleazei duce la distrugerea structurii terţiare, care se poate însă reface în proporţie de 95—100%* odată cu *reoxidarea moleculei în condiţii adecvate*. Calculele statistice arată că, dacă refacerea legăturilor disulfurice ar fi întîmplătoare, atunci numai aproximativ 1% din molecule şi-ar recîştiga structura nativă. Deoarece refa-

cerea structurii terțiare generează, mai mult ca sigur, termodinamic structura cea mai stabilă, rezultă că *proteinele native există în conformația cea mai stabilă din punct de vedere termodinamic*, conformație determinată în ultimă instanță de structura primară.

O dovadă a *condiționării nivelelor superioare de organizare a structurii proteinelor de către structura primară*, o constituie, și faptul *că dacă în unul din lanțurile moleculei de hemoglobină, de exemplu, se substituie un aminoacid prin altul, rezultă o moleculă diferită și structural și funcțional.* Acest lucru dovedește, pe de o parte, că structura primară determină și organizarea structurală a nivelelor superioare, și, pe de altă parte *strînsa corelație dintre funcțiunile biologice și nivelul primar de organizare structurală al moleculei.*

Clasificarea structurii moleculelor proteice în cele patru nivele de organizare, preconizată de Lindestrom-Lang nu întrunește condițiile necesare spre a fi unanim acceptată. Unii autori consideră, de exemplu, că toate legăturile covalente, deci inclusiv legăturile disulfurice sînt elemente ale structurii primare. Alți autori clasifică punțile disulfurice printre elementele structurii terțiare. Asemenea interpretări sînt și în legătură cu conținutul noțiunii de structură secundară în cadrul căreia *unii nu recunosc decît structura elicoidală.*

În opoziție cu această clasificare considerată artificială D. B. Wetlaufer a introdus noțiunea mai elastică de *conformație în lanț*, care include vechile noțiuni de structură primară, secundară, terțiară și cuaternară și care este *utilizabilă nu numai pentru proteine ci și pentru alți biopolimeri (poliglucidele și acizii nucleici).* Această concepție a conformației în lanț privește macromolecula proteică sub două aspecte : *secvența aminoacizilor* din catenele polipeptidice căreia îi corespund *noțiunea de structură primară*; *conformația catenei polipeptidice care înglobează structura secundară și terțiară.* Termenul de *conformație* * își găsește adevărata sa semnificație în structuri care se diferențiază doar prin posibilitatea răsucirii legăturilor chimice (*configurația* * se menține neschimbată). În locul termenului de structură cuaternară Wetlaufer introduce pentru proteinele alcătuite din mai multe subunități polipeptidice termenul de *organizare (aranjarea) subunităților* (cu denumirea originală „subunity array"), care se referă la *modul în care sînt dispuse catenele polipeptidice* în macromolecule policatenare.

Modelul *conformației în lanț* simplifică interpretarea structurii proteinelor, scoțînd în evidență cu mai multă claritate faptul că structura tridimensională a proteinelor, al cărei rol în determinarea funcțiunilor biologice este incontestabil, reprezintă rezultatul interacțiunilor strînse dintre secvența aminoacizilor din catenele polipeptidice și parametrii fizico-chimici ai mediului celular intern în care se desfășoară activitatea biologică a proteinelor respective.

---

* *Configurația* este repartizarea în spațiul tridimensional a atomilor sau grupelor de atomi în raport cu un centru de referință (ex. atomul de carbon asimetric) sau cu o unitate structurală considerată rigidă (de ex. o dublă legătură sau un ciclu). *Conformația* este repartizarea în spațiul tridimensional a atomilor sau grupelor de atomi, în cadrul aceleiași configurații, ca rezultat al rotirii în jurul legăturilor simple din moleculă. În cadrul aceleiași configurații o moleculă de proteină se poate prezenta în diverse conformații.

În ciuda criticilor, în bună parte justificate, la care a fost supusă clasificarea structurii proteinelor în cele patru nivele de organizare, ea continuă să rămînă extrem de sugestivă și deci de mare utilitate cel puțin pentru modul sistematic și accesibil în care sînt prezentate dificilele probleme legate de structura proteinelor.

3.3.6 Metode de investigare a structurilor secundare și terțiare ale moleculelor proteice

În rezolvarea problemelor dificile pe care le pune complexa organizare structurală a catenelor polipeptidice se utilizează cu succes metodele fizico-chimice de investigare.

Spectroscopia în infraroșu prin care se *studiază modificările survenite în spectrul IR ca urmare a diverselor modalități de organizare structurală a catenelor polipeptidice*. Benzile cel mai mult studiate corespund celor ale vibrației de valență a legăturii CO (γCO, numită și banda amidă I) și ale vibrației de deformare a grupării NH (δNH, numită și banda amidă II). După cum se vede din tabelul 3.6 frecvențele acestor benzi variază cu conformația moleculei și în consecință pot da indicații prețioase în acest sens.

TABELUL 3.6

Organizarea structurală a catenelor polipeptidice și vibrațiile de valență ale legăturilor γ CO (amida I) și δ NH (amida II)

Conformație	*Banda*	
	Amida I	*Amida II*
Dezordonată (random coil)	1 656 (*i*) *	1 535 (*i*)
α-helicoidală	1 650 (*i*)	1 516 (*s*)
	1 652 (*m*)	1 546 (*i*)
Structură pliată paralel	1 654 (*s*)	1 530 (*i*)
	1 630 (*i*)	1 550 (*s*)
Structură pliată antiparalel	1 685 (*s*)	1 530 (*i*)
	1 632 (*i*)	

* *i* = intens; *m* = mediu; *s* = slab

Dicroismul în infraroșu utilizează radiații infraroșii plan polarizate în studiul cristalelor. Dicroismul în infraroșu apare ca rezultat al faptului că absorbția maximă a radiației are loc atunci cînd direcția momentului de tranziție a vibrației luate în discuție este paralelă cu planul de vibrație al vectorului electric al radiației. Utilizarea acestei metode evidențiază la *β-keratină*, de exemplu, prezența unui dicroism perpendicular pentru vibrațiile de valență νNH și νC = O și dicroism paralel pentru vibrațiile δNH, ceea ce *indică orientarea aproximativ perpendiculară a grupelor* N—H și C=O *pe axa fibrei* (fig. 3.18). În cazul α-keratinei benzile νN—H și νC=O au dicroism paralel, în consecință legăturile respective sînt orientate paralel cu axa fibrei (fig. 3.17).

Puterea rotatorie optică a moleculelor asimetrice constă în faptul că o rază de lumină monocromatică plan-polarizată poate fi considerată ca fiind alcătuită din două componente circular polarizate spre stînga și spre dreapta. Cînd această rază trece printr-un mediu care are indici de

refracție deosebiți (în cazul proteinelor asimetria α-helixului și asimetria resturilor de aminoacizi) pentru cele două componente, planul de polarizare este rotit (*rotație optică*), deoarece mediul transmite cele două componente cu viteze inegale. Dacă mediul, de asemenea, absoarbe inegal cele două componente polarizate circular, adică dacă mediul manifestă *dicroism circular*, raza de lumină emergentă este polarizată eliptic. Fenomenele combinate, viteza de transmisie diferită și absorbția inegală, sînt cunoscute sub numele de *efect* Cotton. De fapt, procedeul experimental constă în măsurarea rotației optice în funcție de lungimea de undă, deci *dispersia rotatorie optică*, care incorporează atît efectele indicelui de refracție a mediului asupra rotației luminii cît și absorbția inegală a celor două componente polarizate circular. Măsurarea dicroismului circular este valabilă pentru detectarea *cromoforilor optic activi*.

Dispersia rotatorie optică *furnizează informații asupra structurii proteinei, a apoenzimei, în cazul enzimelor*. În general, precum și asupra *configurației situsurilor catalitic active* ale enzimei. În special Blout consideră că *efectele* Cotton care apar la proteine pot fi împărțite în trei tipuri distincte: *efectele* Cotton *intrinseci* care iau naștere din asimetria rotațională a cromoforilor din catena polipeptidică, *efectele* Cotton *de catenă* care sînt datorate mediului asimetric din configurația înalt organizată a proteinelor și pot lua naștere din împiedicarea rotației în jurul α-atomului de carbon din resturile de cisteină, fenilalanină, triptofan și tirozină și *efectele* Cotton *extrinseci*, care sînt datorate interacției asimetrice a grupărilor prostetice, coenzimelor, substratelor, inhibitorilor sau ionilor metalici cu proteinele.

Astfel de interacții stereospecifice ale compușilor cromoforici cu proteinele au ca rezultat fenomene caracteristice de dispersie rotatorie optică care sînt distincte de cele caracteristice pentru conformația proteinei pure. Toate aceste forme de asimetrie pot contribui la puterea rotațională a unei proteine (deși într-un grad variat) și pot deveni manifeste numai prin analiza detaliată a unei curbe de dispersie rotatorie optică. Aceste efecte Cotton extrinseci contribuie în mare măsură la puterea rotatorie optică totală în cazul metaloenzimelor. Rotația de bază care ia naștere datorită resturilor de aminoacizi care alcătuiesc structura primară a unei proteine este mai întîi modificată prin suprapunerea efectelor Cotton intrinseci induse de configurația ei, peste care se suprapun efectele Cotton extrinseci care la rîndul lor alterează rotația de bază.

Efectele Cotton observate la unele metaloproteine furnizează dovezi fizice asupra naturii asimetrice a situsului de legare a atomului metalic. În urma unui aranjament steric, se formează un situs de grupări reactive, care orientează și leagă metalul de structura proteică. Proprietățile rotatorii optice ale acestor complecși devin caracteristice și pot constitui un instrument experimental de elucidare a modului de legare al metalului (și chiar a mecanismului de acțiune dacă metaloproteina este o enzimă). Astfel, măsurarea în timp a dispersiei rotatorii optice furnizează o modalitate de a diferenția legarea stereo specifică a atomilor de metal (numărul de atomi-gram de metal legați stereospecific la un mol de proteină), de legarea nespecifică la alte situsuri, indicată de măsurătorile spectrale.

Deși zincul nu dă cromofori ușor detectabili prin măsurarea dispersiei rotatorii optice, Zn-enzimele pot genera efecte Cotton extrinseci prin

interacţia lor asimetrică cu coenzimele, analogi ai coenzimelor, substrate sau inhibitori. De exemplu, interacţia agenţilor de chelatizare cromofori, de tipul 1,10-*fenantrolinei*, care leagă reversibil zincul din diferite dehidrogenaze (*alcool dehidrogenaza*, *lactat dehidrogenaza*) induce o dispersie rotatorie anormală datorită formării unui complex enzimă-zinc-reactiv. În cazul lactat-dehidrogenazei, spre deosebire de cromoforul LDH—NADH, complexul LDH-Zn-fenantrolină manifestă un efect Cotton la 297 nm, lungime de undă la care absoarbe maxim cromoforul şi un al doilea efect Cotton în dispersia rotatorie, datorat unei benzi de absorbţie, la 313 nm, mai puţin intensă. Efectele Cotton ale complecşilor enzimă-coenzimă şi enzimă-zinc-fenantrolină se modifică independent, mărimea unuia creşte, în timp ce a celuilalt scade, în acord cu comportarea lor cinetică.

Rezonanţa magnetică nucleară. Proprietăţile magnetice ale metaloproteidelor au fost studiate, în principal, cu ajutorul spectrelor de rezonanţă paramagnetică electronică şi de *rezonanţă magnetică nucleară* (*RMN*). Fenomenul de absorbţie, la rezonanţă, a energiei unui cîmp de înaltă frecvenţă de către moleculele, atomii sau ionii unei substanţe paramagnetice aflate într-alt cîmp magnetic, constant, poartă numele de *rezonanţă paramagnetică*. În cazul în care cîmpul magnetic constant este suficient de intens pentru a desface spinul nuclear de sub influenţa electronilor orbitali, la rezonanţa paramagnetică participă numai *momentele magnetice nucleare*, iar fenomenul poartă numele de *rezonanţă magnetică nucleară*. Dacă la rezonanţa paramagnetică participă momentele magnetice datorate mişcării orbitale şi de spin a electronilor, avem de-a face cu fenomenul de *rezonanţă paramagnetică electronică* (*RPE*), iar în cazul în care contribuţia mişcării orbitale a electronilor este nulă, cu *rezonanţa electronică de spin* (*RES*).

Dacă se consideră un nucleu cu un spin I, astfel încît protonul cu $I = 1/2$, este plasat într-un cîmp magnetic static, apare o scindare a nivelului energetic nuclear în două nivele corespunzătoare orientărilor spinului paralel şi antiparalel în cîmpul magnetic. Pot să apară *tranziţii între aceste nivele energetice* şi dacă o probă conţinînd protoni într-un cîmp magnetic H_0 este iradiată cu o radiaţie de o frecvenţă, absorbţia va apărea cînd energia radiaţiei h este egală cu diferenţa de energie dintre cele două stări de spin $2H_0$ (este momentul magnetic al nucleului). Consecinţele acestei relaţii care stă la baza fenomenului RMN sînt :

— pot da naştere acestui fenomen numai acei nuclei pentru care valoarea spinului este diferită de zero ;

— frecvenţele de rezonanţă pot varia prin modificarea mărimii cîmpului magnetic extern şi

— frecvenţele de absorbţie variază considerabil pentru diferiţi nuclei, deoarece valorile momentului magnetic diferă mult, astfel la un cîmp de 10 000 gauss, protonii absorb la aproximativ 42 Mc. Dar caracteristica cea mai pregnantă a acestui tip de spectroscopie constă în *valoarea foarte mică a diferenţelor de energie implicate în tranziţii*, ceea ce asigură eficacitatea acestei tehnici în determinarea structurii şi a configuraţiei molecule-

lor, a interacțiilor dintre molecule. Valoarea mică a diferențelor de energie ale stărilor de spin permite evidențierea următoarelor fenomene:

— *deplasarea chimică*, care depinde de cîmpul magnetic indus de mișcarea electronilor în jurul nucleului;

— *cuplarea spin-spin*, care depinde de interacția cu nucleii magnetici vecini;

— *forma liniei de absorbție* și *timpii de relaxare*, care depind de interacțiile, dependente de timp, cu nucleii magnetici înconjurători.

Rezonanța magnetică a protonului. Hidrogenul are un moment magnetic mare, ceea ce îl face cel mai apt element pentru observarea în *RMN*; într-un cîmp constant protonii absorb la cea mai înaltă frecvență și în consecință poate fi observat numărul cel mai mic de nuclei. Pentru acest motiv cele mai multe aplicații ale *RMN* în biochimie sînt reprezentate de *rezonanța magnetică a protonului* (*RMP*).

În studiile structurale trei parametri sînt măsurați:

— suprafețele de desubtul unei curbe de rezonanță — care sînt proporționale cu numărul de nuclei care absorb;

— deplasările chimice — poziția unei linii de rezonanță este importantă în determinarea naturii legăturii;

— scindările spin-spin — grupările vecine unui nucleu particular exercită influențe asupra rezonanței acelui nucleu în forma interacției spin-spin. Astfel, protonii metilenului vor scinda rezonanța protonilor vecini într-un triplet. Este *multiplicitatea unei linii care dă informații asupra grupărilor vecine*. Energia interacției între nucleii vecini poate fi exprimată prin constantele de cuplare *J*.

Metoda schimbului izotopic. O *tehnică* adesea utilizată în studiul structurii proteinelor și a mecanismelor acțiunii enzimelor este cea a *înlocuirii specifice a izotopilor*, de exemplu, înlocuirea hidrogenului cu deuteriu, *urmată de observarea RMN*. O astfel de metodă evită scindarea moleculei și se bazează pe posibilitatea pe care o au protonii legați de atomi ce posedă perechi de electroni neparticipanți (O, N, S) de a se înlocui cu mare ușurință cu deuteriul din D_2O. Faptul că unii protoni din molecula proteinelor realizează foarte încet schimbul $H \rightleftharpoons D$ a fost pus în legătură cu implicarea acestora în legăturile de hidrogen ale structurii helicoidale, care îi protejează de acțiunea solventului. În cazul insulinei, de exemplu, din cei 49 de atomi de hidrogen ai legăturilor peptidice, 30 se înlocuiesc greu, de unde se trage concluzia că aproximativ *61% din atomii de hidrogen ai legăturilor peptidice din insulină sînt implicați în structura helicoidală*.

Primul spectru *RMN* al unei proteine a fost realizat de S a u n d e r s și c o l a b. (1957), în mediu D_2O pentru ribonuclează. Astăzi această tehnică este larg utilizată în studiul enzimelor în general și al metaloenzimelor, în particular. În ultimul caz, sînt bine cunoscute cercetările vitezei de relaxare a protonilor din apă efectuate în laboratoarele conduse de C o h n (1962), pentru examinarea cineticii interacției metaloenzimelor cu ionii paramagnetici. Relaxarea protonului din apă servește ca probă pentru interacția metalelor, substratelor și enzimelor și pentru interacția ionilor metalici din structura metaloproteidei și metaloenzimei cu apa, prin efectele lor asupra vitezelor de relaxare longitudinală ($1/T_1$). Meca-

nismul principal al relaxării în apă pură constă în interacţia dipol magnetică dintre protoni, care în prezenţa unui ion paramagnetic formează un dipol magnetic proton-electron mult mai mare şi care domină viteza de relaxare. Mn^{2+}, de exemplu, are un moment magnetic foarte mare datorită a cinci electroni neîmperechiaţi, deci are efect asupra vitezei de relaxare a protonilor apei. Mărimea acestui efect este foarte sensibilă faţă de natura mediului din imediata vecinătate a ionului de mangan, astfel dezlocuirea apei de alţi liganzi ai Mn^{2+} are ca rezultat o scădere a eficienţei ionului şi deci o creştere a vitezei de relaxare a protonilor apei. Se defineşte un factor de mărire ε ca raportul vitezelor de relaxare în prezenţa şi în absenţa unui agent de complexare.

În măsurătorile vitezelor de relaxare a protonului în sistemele enzimatice ce conţin ioni bivalenţi, C o h n şi L e i g h (1962) găsesc că în cazul enzimelor care leagă Mn^{2+} la situsul activ, complecşii metal-proteină prezintă valori ε foarte mari. Mai mult, fiecare complex ternar enzimă-metal-substrat are o valoare ε proprie, ce poate reprezenta un parametru de caracterizare a complexului ternar. În cazul enolazei ε_{binar} este mai mare decît ε_{ternar}, în timp ce pentru creatin kinază, ε_{ternar} este mai mare decît ε_{binar}, ceea ce s-a explicat prin faptul că în primul caz metalul se leagă direct la enzimă, iar în cazul creatin kinazei, numai prin intermediul substratului, constituindu-se un complex ternar.

Investigînd cinci mangan-enzime, M i l d v a n & C o h n (1963) şi C o h n (1963) le clasifică în două grupe pe baza interacţiunii cu Mn^{2+} şi substratele lor particulare :

— în prima categorie sînt incluse : enolaza şi piruvat kinaza pentru care ε(Mn-enzimă) $>\varepsilon$(substrat-Mn-enzimă), în care metalul se leagă direct la enzimă ;

— în a doua categorie sînt incluse : creatin kinaza, 3-fosfoglicerat kinaza şi hexokinaza, pentru care ε(Mn-substrat-enzimă) $>$(Mn-enzimă) indicînd că metalul se leagă la enzimă numai prin intermediul substratului, formîndu-se un complex ternar. În cazul hexokinazei, este postulată existenţa unui complex cuaternar în care este inclusă şi glucoza : enzimă-glucoză-Mn-ADP.

Spectroscopia de rezonanţă electronică de spin (RES) s-a impus în ultimii ani ca un preţios *instrument de cercetare a metaloenzimelor* care conţin ioni paramagnetici. Utilizată iniţial ca o metodă analitică de determinare a prezenţei unui anumit ion paramagnetic (B e i n e r t şi S a n d s, 1960) spectroscopia *RES dă indicaţii şi asupra stării de valenţă a ionului metalic*. Astfel, în cazul cupru-enzimelor prezenţa Cu^{2+} este evidenţiată de puternice semnale *RES*, în timp ce Cu^{+} fiind diamagnetic nu este identificat. Modificarea valenţei unui ion metalic din structura unei metaloenzime poate fi vizualizată şi prin studii *RES*, ca în cazul xantinoxidazei (B r a y, M a l m s t r ö m, V ä n n g ä r d, 1959) şi citocromoxidazei, după adăugarea în mediul de reacţie a substratului. Spectroscopia *RES* a fost utilizată şi în cazul identificării atomilor-ligand din structura hiperfină (P a k e, 1962).

F i s h e r şi c o l a b. (1972) studiind cu ajutorul spectroscopiei *RES fenilalanin hidroxilaza*, enzimă ce conţine 1—2 moli de fier/mol proteină, constată existenţa unui semnal caracteristic ca valoare unui ion

feric de spin înalt. Prin adăugarea substratului (fenilalanina și dimetiltetrahidropterina) 90% din semnalul *RES* dispare, fie datorită reducerii fierului la forma feroasă, fie unei modificări de la starea de înalt spin a Fe^{3+} la starea lui de jos spin, datorate unor schimbări în cîmpul ligandului. Semnalul *RES* reapare în proporție de 40% după barbotarea O_2 în mediul de reacție. Datele de spectroscopie *RES* coroborate cu determinările biochimice ale activității enzimatice arată că fierul este implicat atît în menținerea structurii cuaternare a enzimei cît și în mecanismul catalizei enzimatice, cînd fierul trivalent este redus la fier bivalent, luînd parte la activarea oxigenului.

Ribonucleotid reductaza, izolată din *E. coli* este formată din două proteine inegale, B_1 și B_2 și catalizează reducerea ireversibilă a celor patru ribonucleozid difosfați la oxiribonucleotidele corespunzătoare (Ehrenberg și Reichard, 1972). Donorul de hidrogen al acestei reacții este forma redusă a unei proteine mici — *tioredoxina*. Procesul catalitic necesită prezența simultană a celor două proteine B_1 și B_2 — fiecare luată în parte fiind complet inactivă. Proteina B_1 *leagă efectori alosterici*, fiind implicată în *reglarea activității catalitice*, în timp ce proteina B_2 este constituită din două catene polipeptidice de 40 000 daltoni fiecare și doi atomi de fier strîns legați. Enzima prezintă un spectru de absorbție caracteristic cu un maxim bine delimitat la 410 nm, un maxim mai larg la 360 nm și un „umăr" la 325 nm. *Îndepărtarea fierului* din structura enzimei are drept consecință *pierderea activității catalitice și modificarea caracteristicilor spectrale*, în special la $\lambda = 410$ nm. Studii de spectroscopie *RES* asupra proteinei B_2 indică prezența unui semnal unic. Tratamentul proteinei B_2 cu hidroxilamină sau hidroxiuree are ca rezultat dispariția activității enzimatice, a absorbției la 410 nm și a semnalului *RES* caracteristic. Aceste date arată că cele două constante spectrale sînt expresia acelorași grupări funcționale ale proteinei.

Emisia sau absorbția rezonantă (fără recul) a radiației gamma de lărgime spectrală foarte îngustă de către nucleele atomilor legați rigid într-o rețea cristalină poartă numele de *efect* Mössbauer. Întrucît nucleele Mössbauer trebuie să se găsească într-un solid, proteinele pot fi studiate numai în stare solidă sau în soluții înghețate. Faptul că ^{57}Fe prezintă proprietăți convenabile pentru observarea rezonanței nucleare gamma a permis ca fier-proteinele și fier-enzimele să fie adecvate cercetărilor prin efect Mössbauer. *Parametrii spectrului* Mössbauer *sînt sensibili la legăturile fierului și pot furniza informații asupra structurii electronice și de ligand din jurul nucleului de fier.*

Hemocianinele și *hemoeritrina* sînt dintre cele mai bine studiate metaloproteine, deoarece îndeplinesc funcții importante în procesele respiratorii. Hemocianinele sînt cromproteide de culoare albastră care au o masă moleculară de aproximativ 3 750 000 și se găsesc în hemolimfa diferitelor moluște și artropode, conținînd 2 atomi de cupru la un mol de proteină.

Molecula hemocianinelor prezintă o structură polimeră, disociind ușor în subunități cu mase moleculare de 25 000 și 75 000 în funcție de *p*H, de tăria ionică a mediului și de concentrația în cationi. În această proteină, doi atomi-gram de cupru leagă un mol de oxigen (Avaeva, Mevkh, 1971; Ghiretti și alții, 1963).

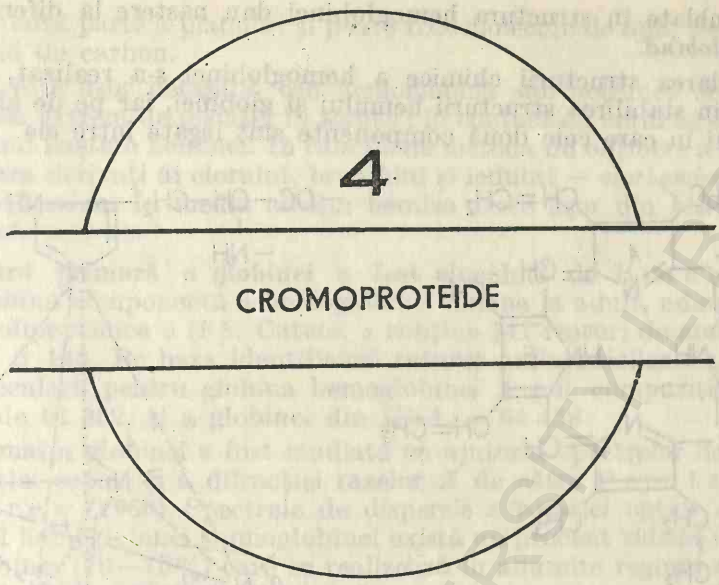
Hemoeritrina este un pigment respirator cu o structură fieroproteică ce apare în sîngele unor animale inferioare marine. Molecula este compusă din opt subunităţi identice de 13 500 daltoni fiecare, conţinînd cîte doi atomi-gram de fier. Un mol de oxigen este legat de cîte doi atomi de Fe^{2+}. Echilibrul este deplasat în favoarea formării octamerului, care se găseşte în starea nativă (K l o t z şi a l ţ i i, 1957, 1963).

Hemoglobina este o altă fier-hemoproteidă, reprezentînd pigmentul respirator al organismelor animale superioare şi al omului. Este o proteină de dimensiuni medii, avînd o masă moleculară de 66 700 şi conţine patru resturi de hem şi patru catene polipeptidice, două catene tip α şi două catene tip β. Fierul din structura moleculei de hemoglobină are satisfăcute cele şase valenţe coordinative, în felul următor : patru — cu atomii de azot pirolici ai scheletului porfirinic şi cea de a cincea cu un rest de histidină din structura globinei; la ultima valenţă se fixează oxigenul, contribuind la funcţia transportoare a acestui pigment respirator. În tot acest proces, fierul rămîne în starea de oxidaţie Fe^{2+}, astfel hemoglobina este oxigenată şi nu oxidată.

Alte metaloproteine transportă ioni metalici, de exemplu, *transferina*, *conalbumina* şi *feritina*. Primele două proteine au structură de glicometaloproteide şi sînt implicate în procesele de transfer ale fierului. Feritina este formată din 20 subunităţi identice de aproximativ 24 000 daltoni fiecare şi reprezintă proteina de stocare a fierului în ţesuturile mamiferelor (cap. 7).

Alte metaloproteine ca *hemovanadina* (vanadiu-proteina din vanadocitele ascidiilor), *ceruloplasmina* (glicoproteidă din serul mamiferelor ce conţine cupru), *cerebrocupreina* (izolată din creierul mamiferelor), *eritrocupreina* (prezentă în eritrocite), *hepato-cupreina* (purificată din ţesutul hepatic) sînt încă în curs de cercetare, funcţia cofactorului anorganic din structura lor rămînînd necunoscută (O s a k i, J o h n s o n, F r i e d e n, 1966; P o r t e r, 1966).

În cazul exemplelor citate mai sus nu s-a putut stabili cu certitudine dacă ionul metalic din structura metaloproteinelor are numai un rol funcţional de transport al oxigenului sau al fierului, sau dacă este implicat şi în stabilizarea structurilor terţiare şi mai ales cuaternare, manifestînd deci şi un rol structural.



Cromoproteidele sînt proteide care conţin în molecula lor o *grupare prostetică colorată.* În funcţie de structura componentei prostetice cromoproteidele se pot clasifica în două mari categorii: *cromoproteide porfirinice* care conţin o structură tetrapirolică de natură porfirinică şi *cromoproteide neporfirinice.*

4.1. CROMOPROTEIDE PORFIRINICE

Dintre cromoproteidele porfirinice fac parte hemoproteinele *hemoglobina, mioglobina, leghemoglobina, citocromii,* enzimele *catalaza* şi *peroxidaza, cruorinele, cloroplastinele.*

La baza acestor cromoproteide se află nucleul porfiric alcătuit din patru inele pirolice legate prin punţi metinice (—CH=). Substituirea atomilor de hidrogen din poziţiile 1—8 ale porfinei dă naştere porfirinelor, dintre care *protoporfirina* este cea mai răspîndită şi cunoscută (fig. 4.1).

4.1.1 Hemoglobinele

Sînt cromoproteide alcătuite din două componente: o *componentă prostetică — hemul* şi o *componentă proteică,* cu proprietăţi bazice — *globina.* Fiecare moleculă de hemoglobină *conţine patru nuclee protoporfirinice* în centrul cărora se găseşte un atom de fier bivalent, hexacoordinat şi *patru catene polipeptidice care formează globina.* Catenele polipeptidice după structura lor pot fi α, β, γ, δ sau ε şi în funcţie de modul în care

sînt asamblate în structura hemoglobinei dau naştere la diferite *tipuri de hemoglobină.*

Elucidarea structurii chimice a hemoglobinei s-a realizat, pe de o parte, prin stabilirea structurii hemului şi globinei, iar pe de altă parte, a modului în care cele două componente sînt legate între ele.

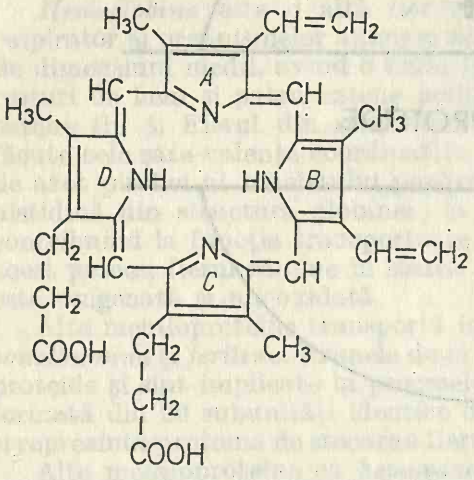


Fig. 4.1 — Structura chimică a protoporfirinei

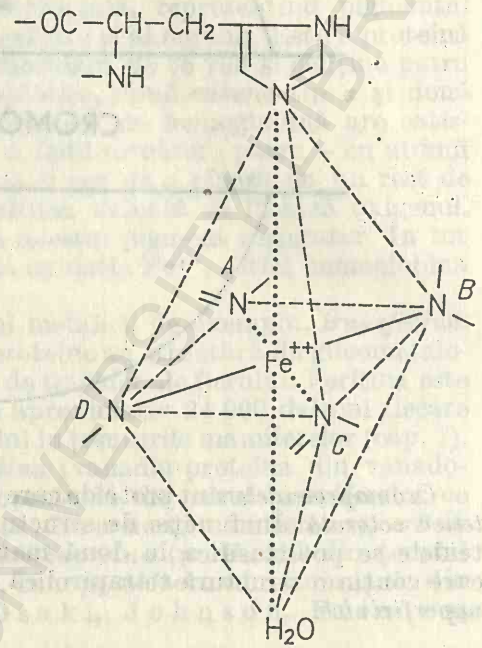


Fig. 4.2 — Reprezentarea celor şase legături coordinative ale fierului prin care se realizează legătura cu protoporfirina, cu globina şi cu o moleculă de apă

În 1949 P a u l i n g a semnalat că hemoglobina bolnavilor de anemie falciformă se comportă electroforetic diferit de hemoglobina subiecţilor normali. Dezvoltarea acestor cercetări de către I n g r a m (1963) a condus la precizarea naturii deosebirilor dintre diferitele tipuri de hemoglobină şi a deschis calea studierii unor boli la nivel molecular.

Structura hemului a fost deplin elucidată atît *prin degradarea treptată a moleculei* şi *identificarea produşilor rezultaţi*, cît *şi prin sinteză.* S-a ajuns astfel la concluzia că hemul este identic cu *protoporfirina* în centrul căreia se găseşte un atom de fier bivalent şi hexacoordinat. Cele patru inele pirolice ale protoporfirinei sînt coplanare între ele şi coplanare şi cu atomul de fier. Măsurătorile magnetice pun în evidenţă o legătură ionică între atomul de fier sub forma Fe^{2+} şi dianionul aromatic porfirinic (format prin îndepărtarea celor doi atomi de hidrogen sub formă de H^+) aparţinînd inelelor pirolice *B* şi *D*.

Dintre cele şase legături coordinative ale fierului (îndreptate spre vîrfurile unui octaedru regulat, fig. 4.2) patru sînt legate în acelaşi plan de cei patru atomi de azot ai nucleelor pirolice, una este îndreptată de o parte a planului şi poate face legătura cu molecula de globină prin intermediul atomului de azot al unui rest de histidină, iar ultima este îndrep-

tată de cealaltă parte a planului și poate fixa molecule de apă, de oxigen sau de oxid de carbon.

Hemul este ușor detașabil din hemoglobină sub acțiunea acizilor și de asemenea extrem de instabil în soluții ; în contact cu aerul se oxidează spontan dînd naștere heminei. În funcție de metoda de obținere a heminei se pot separa derivați ai clorului, bromului și iodului — *clorhemina*, *bromhemina*, *iodhemina*. În mediu alcalin hemina trece ușor din *hidrohemină* în *hematină*.

Structura primară a globinei a fost elucidată de B r a u n i t z e r pentru globina componentă a hemoglobinei umane la adult, adică pentru catenele polipeptidice α și β. Catena α conține 141 resturi de aminoacizi, iar catena β 146. Pe baza identificării tuturor aminoacizilor s-a stabilit masa moleculară pentru globina hemoglobinei *A* (cu compoziția $\alpha_2^A\beta_2^A$), care este de 61 992, și a globinei din HbA_2 — 64 458.

Conformația globinei a fost studiată cu ajutorul spectrelor de dispersie a rotației optice și a difracției razelor *X* de către P e r u t z (1965) și K e n d r e w (1960). Spectrele de dispersie a rotației optice stabilesc că în cazul hemoglobinei și mioglobinei există un procent ridicat de spiralare a globinei (70—75%) care se realizează în anumite regiuni ale catenelor polipeptidice și care alternează cu regiuni care au o conformație întîmplătoare, dezorganizată (nespiralată) ce permite apariția unor curburi și inflexiuni ale catenelor polipeptidice.

Structura catenelor polipeptidice de tip α. Secvența celor 141 de resturi de aminoacizi din catenele (masa moleculară 15 120) hemoglobinelor izolate de la *om*, *cimpanzeu* și *gorilă* este următoarea (D a y h o f f, 1971) :

1 10 20
Val-Leu-Ser-Pro-Ala-Asp-Lys-Thr-Asn-Val-Lys-Ala-Ala-Trp-Gly-Lys-Val-Gly-Ala-His-Ala-
30 40
-Gly-Glu-Tyr-Gly-Ala-Glu-Ala-Leu-Glu-Arg-Met-Phe-Leu-Ser-Phe-Pro-Thr-Thr-Lys-Thr-Tyr-
50 60
-Phe-Pro-His-Phe-Asp-Leu-Ser-His-Gly-Ser-Ala-Glu-Val-Lys-Gly-His-Gly-Lys-Lys-Val-Ala-
70 80
-Asp-Ala-Leu-Thr-Asn-Ala-Val-Ala-His-Val-Asp-Asp-Met-Pro-Asn-Ala-Leu-Ser-Ala-Leu-Ser-
90 100
-Asp-Leu-His-Ala-His-Lys-Leu-Arg-Val-Asp-Pro-Val-Asn-Phe-Lys-Leu-Leu-Ser-His-Cys-
110 120
-Leu-Leu-Val-Thr-Leu-Ala-Ala-His-Leu-Pro-Ala-Glu-Phe-Thr-Pro-Ala-Val-His-Ala-Ser-Leu-
130 140 141
-Asp-Lys-Phe-Leu-Ala-Ser-Val-Ser-Thr-Val-Leu-Thr-Ser-Lys-Tyr-Arg.

Catenele polipeptidice α din Hb*F* sînt identice cu cele din Hb*A*.* În secvența catenei sînt scrise cu litere groase resturile de prolină care determină curburi ale lanțului, ca și resturile de histidină care participă la legarea hemului (*His*—58 și *His*—87).

Conformația acestui lanț polipeptidic format din 141 de resturi de aminoacizi este asigurată mai ales prin forțe v a n d e r W a a l s care apar între resturile nepolare ale aminoacizilor, orientate înspre interiorul moleculei ; resturile polare sînt orientate înspre mediul apos exterior. Această

* V. tipurile de hemoglobină la pag. 158.

repartiție diferențiată a resturilor aminoacizilor conferă stabilitate ansamblului molecular.

Catenele de tip α sînt împărțite în opt regiuni sau segmente distincte *A-H*. Segmentul *A* conține resturile a 19 aminoacizi, segmentul *B* este alcătuit din resturile a 17 aminoacizi după care urmează un rest de *Pro care neîncadrîndu-se în α-spirală determină o curbură pronunțată a catenei*. Segmentul *C* este nespiralat și are forma literei *S*. Următoarele două segmente, *D* și *E*, conțin împreună 24 resturi de aminoacizi și *prezența unei secvențe nespiralate determină o curbură a lanțului cu 90°*, după care urmează segmentul *F* alcătuit din 10 resturi de aminoacizi. *Resturile de Pro din pozițiile 114 și 119 determină ultimele două curburi* ale segmentului final *H*.

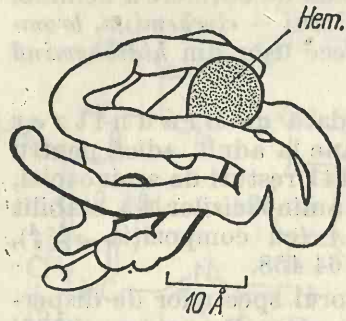


Fig. 4.3 — Modelul structurii terțiare a hemoglobinei (după Perutz)

Catenele polipeptidice sînt astfel orientate în spațiu încît formează în regiunile *EFG* și *C* o cavitate în care este inclusă molecula de hem (numerotarea segmentelor este aceeași ca în fig. 3.24).

Catenele polipeptidice de tip β sînt alcătuite din 146 de resturi de aminoacizi așezați în următoarea ordine (Braunitzer și alții 1961) în hemoglobinele izolate de la *om*, *cimpanzeu*, *gorilă* și *gibon*:

1 10 20
Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu-Glu-Lys-Ser-Ala-Val-Thr-Ala-Leu-Trp-Gly-Lys-Val-Asn-Val-
30 40
-Asp-Glu-Val-Gly-Gly-Glu-Ala-Leu-Gly-Arg-Leu-Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Glu-Arg-
50 60
-Phe-Phe-Glu-Ser-Phe-Gly-Asp-Leu-Ser-Thr-Pro-Asp-Ala-Val-Met-Gly-Asn-Pro-Lys-Val-
70 80
-Lys-Ala-His-Gly-Lys-Lys-Val-Leu-Gly-Ala-Phe-Ser-Asp-Gly-Leu-Ala-His-Leu-Asp-Asn-
90 100
-Leu-Lys-Gly-Thr-Phe-Ala-Thr-Leu-Ser-Glu-Leu-His-Cys-Asp-Lys-Leu-His-Val-Asp-Pro-
110 120
-Glu-Asn-Phe-Arg-Leu-Leu-Gly-Asn-Val-Leu-Val-Cys-Val-Leu-Ala-His-His-Phe-Gly-Lys-
130 140
-Glu-Phe-Thr-Pro-Pro-Val-Glu-Ala-Ala-Tyr-Glu-Lys-Val-Val-Ala-Gly-Val-Ala-Asn-Ala-Leu-
146
-Ala-His-Lys-Tyr-His.

Resturile de histidină (His—63 și His—92) care participă la legarea catenei polipeptidice β la nucleul hemului sînt scrise cu literă groasă.

Legarea hemului de catenele polipeptidice de tip α ale globinei se realizează prin intermediul a două resturi de histidină din pozițiile 58 și 87. Legarea cu cele două resturi se face diferit: restul histidinic din poziția 87 din segmentul *F* se leagă direct de atomul de fier prin una din legăturile coordinative ale acestuia, pe cînd restul histidinic din poziția 58 (segmentul *E*) se presupune că se leagă doar indirect de hem cu ajutorul unei legături de hidrogen realizate prin intermediul moleculei de apă care se găsește legată coordinativ de fier (fig. 4.4). În cazul catenelor de tip β la legarea hemului participă nucleele imidazolice ale resturilor de histidină din poziția 92 și 63.

Între hem și globină se mai pot stabili și alte legături polare între radicalii acidului propionic din pozițiile 6 și 7 ale protoporfirinei și grupării $-\overset{+}{N}H_3$ din catenele polipeptidice, forțe van der Waals între grupările metil și vinil ale hemului și resturile de triptofan, fenilalanină și

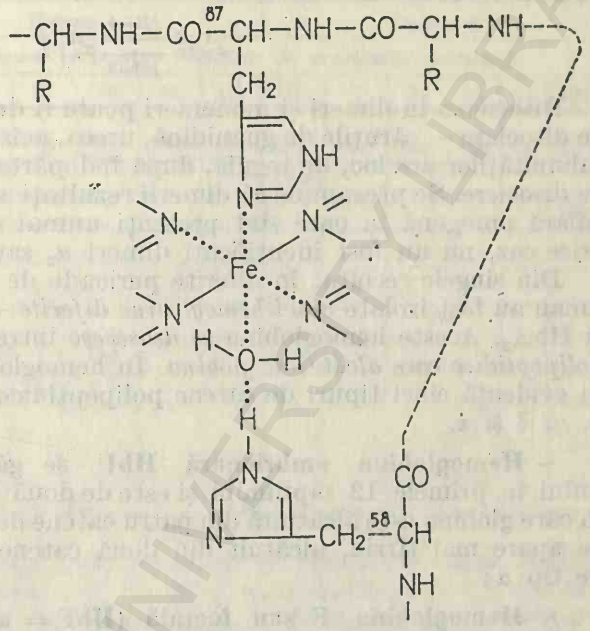


Fig. 4.4 — Legarea hemului prin două resturi de *His* (58 și 87) din catenele polipeptidice de tip α ale globinei

inelele pirolice din hem, cu atît mai mult cu cît există un paralelism între planurile unora din aceste nuclee aromatice și planul hemului.

Ultimul și cel mai complex nivel de organizare al structurii hemoglobinei (structura cuaternară) este reprezentat de aranjarea celor patru lanțuri polipeptidice în molecula tetrameră a hemoglobinei. Asamblarea celor patru subunități, două catene α și două catene β se realizează în modul cel mai compact posibil (fig. 4.5), dînd astfel naștere moleculei globulare a hemoglobinei cu dimensiunile 64/55/52 Å. Forțele care leagă între ele cele patru unități sînt de natură polară în cazul legării lanțurilor identice (α cu β și β cu β) și se stabilesc în special între grupările $-COO^-$ — terminale și $-\overset{+}{N}H_3$ terminale. Legăturile între subunitățile diferite (α cu β) sînt reprezentate prin legături de hidrogen și forțe van der Waals și se realizează de-a lungul unor zone mai lungi din cadrul lanțurilor polipeptidice. Molecula hemoglobinei astfel formată (Hb*A*)

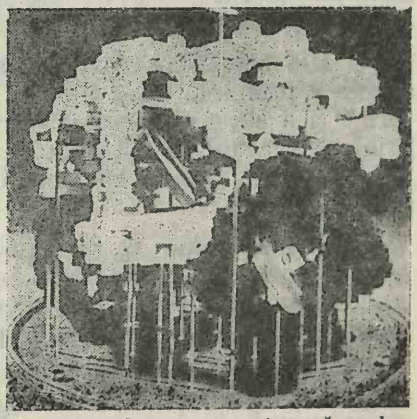


Fig. 4.5 — Structura cuaternară a hemoglobinei. Catenele polipeptidice de tip α sînt redate prin culoarea alb, catenele polipeptidice de tip-β sînt redate prin culoarea negru

are o masă moleculară de 64 458 în care globina aduce un aport de 96% iar hemul de 4% (0,34% Fe).

Molecula tetrameră a hemoglobinelor poate fi scindată în mod reversibil în două jumătăți asimetrice prin modificarea *p*H : în mediu acid are loc scindarea, iar în mediu neutru reasamblarea :

$$\alpha_2^A \beta_2^A \underset{pH=7}{\overset{pH=4}{\rightleftharpoons}} \alpha_2^A \beta_2^A$$

Disocierea în dimeri și monomeri poate fi determinată și de alți agenți de disociere — sărurile de guanidină, ureea, acizii, alcaliile etc. Reasocierea subunităților are loc, de regulă, după îndepărtarea din mediu a agentului de disociere. Se presupune că dimerii rezultați alcătuiesc o populație moleculară omogenă în care sînt prezenți numai dimerii de forma $\alpha\beta$; în orice caz, nu au fost identificați dimeri α_2 sau β_2.

Din sîngele recoltat în diferite perioade de dezvoltare a organismului uman au fost izolate *cinci hemoglobine diferite* — Hb*U*, Hb*F*, Hb*A*, HbA_2 și HbA_3. Aceste hemoglobine *se deosebesc* între ele *după natura catenelor polipeptidice care alcătuiesc globina*. În hemoglobinele umane au fost puse în evidență cinci tipuri de catene polipeptidice care au fost notate cu α, β, γ, δ și ε.

— **Hemoglobina embrionară HbU** se găsește în sîngele embrionului în primele 12 săptămîni și este de două tipuri : tipul Gower-1 în care globina este alcătuită din patru catene de tip ε și tipul Gower-2, ce apare mai tîrziu, alcătuit din două catene de tip ε și două catene de tip α;

— **Hemoglobina F sau foetală** (**HbF** = $\alpha_2^A \beta_2^F$) predomină cantitativ în sîngele fătului, iar la noul-născut se găsește în proporție de 70 — 75% (Bratu, 1969). Acest tip de hemoglobină este înlocuit treptat în mod normal în organismul adult de Hb*A*, dar în unele cazuri patologice (*talasemia majoră, anemia drepanocitară, anemia pernicinoasă, leucemia, anemia* Biermer etc. sau în boala denumită *persistența ereditară a* Hb*F*) se găsește și în sîngele adulților;

— **Hemoglobina A** care începe să fie sintetizată după unii autori în a 13-a săptămînă, după alții în cea de a 25-a săptămînă a vieții intrauterine și a cărei concentrație crește treptat (20% la naștere, 50% după primele trei luni de viață, 90% după șase luni și 95—99% la adult) este alcătuită din 2 catene α și două catene β, formînd un tetramer cu formula HbA = $\alpha_2^A \beta_2^A$;

— **Hemoglobina A_2**, descrisă în 1955 de Kunkel și Wallenius, este o componentă minoră (2,5—3,5% din hemoglobina totală a organismului uman adult), are structura HbA_2 = $\alpha_2^A \beta_2^A$ și concentrația ei în sînge poate crește de 2—3 ori peste valorile normale în *talasemia minoră*;

— **Hemoglobina A_3** se găsește în sînge în cantități variabile și concentrația ei crește în probele de sînge învechit. Spre deosebire de Hb*A* ultima conține în structura ei un fragment peptidic, probabil, glutation.

În literatura biochimică au fost descrise peste 120 de tipuri diferite de hemoglobină, denumite la început după literele alfabetului latin, iar ulterior după localitatea în care au fost descoperite. În tabelul 4.1 sînt

TABELUL 4.1

Diferite tipuri de hemoglobină cu indicația pozițiilor resturilor de aminoacizi substituite în catenele polipeptidice de tip α și de tip β

Tipul de hemoglobină	*Catena α*						*Catena β*					
	Natura și poziția resturilor de aminoacizi substituiți											
	16	30	57	58	63	116	6	7	26	63	67	121
Hb*A*	Lys	Glu	Gly	His	Asn	His	Glu	Glu	Glu	His	Val	Glu
Hb*C*							Lys					
Hb*D* — Punjab												Gln
Hb*E*									Lys			
Hb*G* — Philadelphia					Lys							
Hb*I*	Asp											
Hb*M* — Boston				Tyr								
Hb — Norfolk			Asp									
Hb*M* — Saskatoon										Tyr		
Hb*O* — Indonezia						Lys						
Hb*M* — Milwaukee											Glu	

redate tipurile de hemoglobine mai răspîndite și substituirile unor resturi de aminoacizi în catenele de tip α și de tip β cu resturile unor alți aminoacizi. Aceste substituiri pot fi după natura consecințelor lor *substituiri conservatoare* (cînd Hb îndeplinește funcțiile fiziologice normale și modificarea nu se transmite ereditar) și *substituiri alternante* care provoacă diferite stări patologice cunoscute sub denumirea de *hemoglobinopatii* sau hemoglobinoze. Substituirea resturilor de aminoacizi poate surveni la diferite nivele ale catenelor polipeptidice α, β, γ, δ care intră în structura globinei și uneori, de exemplu, în cazul Hb*S* în care un singur aminoacid — acidul glutamic a fost înlocuit cu valina — substituirea poate fi letală pentru organism (Hb*S* — $\alpha_2^A \beta_2^6$ Glu → Val), provocînd boala denumită *anemia falciformă*. Uneori se întîlnesc și cazuri cînd hemoglobina este alcătuită din patru catene polipeptidice identice, de exemplu, *hemoglobina lui* B a r t care are structura Hbγ_4 și *hemoglobina H*, cu structura Hb*H* β_4; după ultimii autori ultima ar reprezenta forma hemoglobinei lui B a r t găsită la adult.

Dintre hemoglobinopatiile cunoscute numai cîteva prezintă importanță pentru clinica și practica medicală: *hemoglobinopatiile S, C, E* și *talasemia*. B r a t u în 1969 descrie pentru țara noastră anemiile provocate de hemoglobinopatiile *S* și *C* și de talasemie, deși frecvența acestora este relativ mică în comparație cu incidența de 25% observată pentru continentul african. Tot B r a t u și c o l a b. descriu în 1971 o hemoglobină $A_{\text{București}}$ (Hb$A\alpha_2^A \beta_2^{42}$ Phe → Ser) care în comparație cu hemoglobina normală are o afinitate mult mai mică față de oxigen.

Polimorfismul hemoglobinei este răspîndit și în lumea animală, și a fost studiat mai temeinic la animalele domestice în scopul găsirii unor

corelaţii cu alţi parametri fizico-biologici. La vertebrate se întîlnesc mai multe *hemoglobine fiziologice*: Hb*E* — *hemoglobina embrionară*; Hb*F* *hemoglobina fetală*; Hb*J* — *hemoglobina juvenilă*, Hb*A* (sau de *tip rapid*); Hb*B* (sau de *tip lent*) şi Hb*AB*.

La unele animale domestice nu sînt prezente toate tipurile de hemoglobină; de exemplu, la porc nu a fost semnalată Hb*F*, în timp ce Hb*J* nu a fost încă izolată de la ovine, porcine şi cabaline. În privinţa hemoglobinelor întîlnite în sîngele animalelor mature sexual — Hb*A* şi Hb*B* — se poate afirma cu certitudine că nu a fost descrisă nici o rasă de animale domestice care să aibă exclusiv tip Hb*B*; de regulă, rasele prezintă ambele tipuri de hemoglobină specifice adultului, Hb*A* şi Hb*B*, cu predominarea unuia din ele. Se pare că procentul de saturare în oxigen Hb*A* este mai mare decît în cazul Hb*B*. C a z a c u încearcă într-o lucrare din 1971 să coreleze tipul de hemoglobină cu unele însuşiri ale organismului (fertilitate, precocitate, productivitatea maximă a individului, origine filogenetică, standardul rasei etc.).

La vertebrate, au fost descrise, de asemenea, hemoglobinopatii. Astfel, de la ovinele adulte s-a izolat un alt tip de hemoglobină — Hb*D* care reprezintă 10—20% din cantitatea totală de Hb*B* a cărei concentraţie scade la 30—40%, în timp ce Hb*A* rămîne constantă (50%). Tot la ovine, dar mai ales la cele cu hemoglobină de bază de tipul Hb*A* sau Hb*AB* se întîlnesc şi două hemoglobinopatii — Hb*C* şi Hb*N*.

Studierea globinei şi îndeosebi a secvenţei aminoacizilor din structura catenelor polipeptidice α şi β s-a dovedit importantă nu numai pentru cunoaşterea modificărilor survenite în patologia hemoglobinei dar şi pentru *studiile de evoluţie bazate pe paleogenetică chimică*. Astfel, de exemplu, studiul comparat al hemoglobinelor a arătat că Hb de cal se deosebeşte prin poziţia a 26 resturi de aminoacizi din catena β, cea de porc prin 10, iar cea de gorilă printr-un singur rest faţă de structura catenei β din Hb umană. Se apreciază că *pentru o substituire în secvenţa aminoacizilor care să asigure supravieţuirea organismului sînt necesari 10 milioane de ani*. Se presupune că dintr-o *moleculă ancestrală* de globină s-a desprins mai întîi, în cursul evoluţiei, mioglobina şi ulterior hemoglobina de *Lampetra fluviatilis*. Mai tîrziu structura catenelor α şi β a evoluat prin *dedublare genetică*, catenele γ fiind de dată mai recentă.

Proprietăţile hemoglobinelor. Hemoglobinele sînt substanţe *cristalizabile* şi, ceea ce este mai important pentru diferenţierea lor, ele cristalizează în mod diferit. Astfel *oxihemoglobina din sîngele de cal* cristalizează în *ace monoclinice*, cea din *sîngele de cobai* în *tetraedri*, cea *de la cîine* în ace *ortorombice*, iar *hemoglobina oxigenată cristalizată de la om, în bipiramide ortorombice simetrice*. Această proprietate face posibilă diferenţierea sîngelui de om de celelalte feluri de sînge, fapt utilizat în analizele efectuate în laboratoarele criminalistice.

Specificitatea de specie a hemoglobinelor se datoreşte specificităţii globinei care variază de la specie la specie.

În cadrul moleculei hemoglobinei legarea complexă a hemului de globină este de o deosebită însemnătate pentru ambele componente, dovedindu-se pe de o parte, că globina liberă este mai uşor modificată sub acţiu-

nea agenților denaturanți decît globina legată de hem, iar pe de altă parte, că hemul liber este mult mai sensibil la agenții oxidanți decît hemul din hemoglobină.

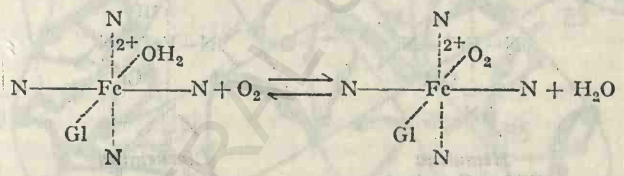
Cea mai importantă proprietate a hemoglobinei, legată de rolul pe care-l joacă în organism, este fără îndoială *proprietatea de a se combina în mod reversibil cu oxigenul*, dînd naștere la *oxihemoglobină*:

$$Hb + O_2 \rightleftharpoons HbO_2$$

Sensul deplasării echilibrului acestei reacții depinde de presiunea parțială a oxigenului: cînd presiunea parțială a oxigenului este mare, de exemplu, în alveolele pulmonare (aprox. 100 mm Hg), fiecare 100 ml sînge fixează aproximativ 19,6 ml oxigen (echilibrul deplasat spre dreapta), iar cînd presiunea parțială a oxigenului este mai mică (35 mm Hg cum este, de exemplu, în țesuturi la nivelul vaselor capilare), echilibrul este deplasat în sensul descompunerii oxihemoglobinei, deci a punerii în libertate a oxigenului. Astfel fiecare 100 ml sînge eliberează 7—9 ml oxigen la nivelul țesuturilor unde au loc arderile, iar hemoglobina eliberată își reia rolul ei de transportor și alimentator cu oxigen al organismului. Se remarcă faptul că hemoglobina *F* (fetală) are o afinitate mai mare față de oxigen decît hemoglobina normală (Hb*A*), ceea ce are o semnificație fiziologică deosebită în procesul de alimentare cu oxigen a țesuturilor embrionare.

Fixarea reversibilă a oxigenului are loc prin intermediul atomului de fier, de care oxigenul se leagă coordinativ fără ca fierul să treacă în forma sa superioară de valență, deci fără să se oxideze.

Schematic această reacție poate fi redată astfel:



Deși fierul hemului este cel care leagă propriu-zis oxigenul, totuși în lipsa globinei hemul singur pierde această capacitate de legare a oxigenului, de unde se deduce faptul că *interacțiunea hemului și globinei este indispensabilă în fenomenul fixării reversibile a oxigenului de către hemoglobină.* Un rol deosebit în fixarea reversibilă a oxigenului și în protejarea împotriva oxidării atomului de fier bivalent se atribuie celor două resturi de histidină din pozițiile 58 pentru catena α și 63 pentru catena β. Într-adevăr substituirea histidinei din aceste poziții (în cazul hemoglobinelor patologice HbM_B și HbM_S) cu molecule de tirozină face să dispară acest rol protector și Fe^{II} se oxidează ireversibil la Fe^{III} (methemoglobină), caz în care hemoglobina nu mai poate reacționa reversibil cu oxigenul.

Hemoglobina are, de asemenea, proprietatea de a reacționa reversibil și cu bioxidul de carbon dînd naștere la *carbhemoglobină*, compus de mare importanță în transportul CO_2 de la țesuturi (presiune parțială mai mare de CO_2) înspre plămîni (presiune parțială mai mică de CO_2). Legarea bi-

oxidului de carbon se realizează prin intermediul unei grupări amino libere a globinei :

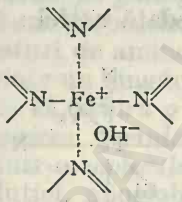
$$Hb-NH_2+CO_2 \rightleftharpoons Hb-NH-COO^-+H^+$$

Hemoglobina reacţionează ireversibil cu oxidul de carbon, dînd naştere la *carboxihemoglobină*, compus în care legarea componentelor se face tot coordinativ fără modificarea valenţei atomului de fier.

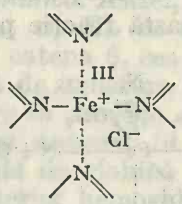
$$Hb + CO \rightleftharpoons HbCO$$

Afinitatea hemoglobinei pentru CO este de aproximativ 210 ori mai mare decît afinitatea pentru O_2, astfel că în prezenţa CO în aerul inspirat, hemoglobina nu mai leagă oxigenul ci oxidul de carbon. Acesta este motivul nocivităţii acestui compus, care poate provoca moartea prin asfixie (lipsă de oxigen la ţesuturi). Dacă mai mult de 50% din hemoglobină este blocată prin combinarea sa cu oxidul de carbon, este necesar un aport masiv de oxigen (presiune parţială mare de oxigen) sub formă de inhalaţii cu oxigen sub presiune, în scopul deplasării echilibrului înspre formarea oxihemoglobinei, respectiv a descompunerii carboxihemoglobinei.

Sub acţiunea oxidanţilor fierul bivalent din molecula hemoglobinei este oxidat la fier trivalent, obţinîndu-se astfel *methemoglobina* în care componenta prostetică e reprezentată de *hematină* şi care nu mai posedă proprietatea de a lega oxigenul. Deoarece în eritrocite ia naştere în permanenţă methemoglobină, organismul posedă enzime reducătoare (methemoglobin reductaze), care împiedică această oxidare, menţinînd echilibrul



Hematina
(hidroxihemina)



Clorhemina

$Hb \rightleftharpoons HbM$ puternic deplasat spre stînga, astfel ca methemoglobina să nu poată atinge o valoare de peste 0,4% din totalul hemoglobinei.

În organismul uman cantităţi mărite de methemoglobină pot să apară fie ca urmare a insuficienţei activităţii enzimatice a acestor enzime, fie datorită unor modificări genetice în secvenţa aminoacizilor (la nivelul poziţiei α-58 şi β-63) care au ca rezultat micşorarea rezistenţei fierului la oxidare. Acest fenomen poate apărea şi în organismul sănătos în cazul unui aport accidental de agenţi oxidanţi puternici, cărora enzimele reducătoare nu le pot face faţă. Şi administrarea unor medicamente poate avea acest efect, însă dispare în scurt timp.

În prezenţa acidului acetic şi a ionilor de clor (HCl sau NaCl) componenta prostetică a hemoglobinei se transformă în *clorhemină*, în care fierul trivalent se leagă ionic de un ion de Cl^-. Reacţia este sensibilă, obţinîndu-se cristale caracteristice de clorhemină (cristalele lui T e i c h m a n),

care servesc la punerea în evidenţă a urmelor de sînge. În general, produşii similari hemului ce conţin fier trivalent poartă numele de *hemine*.

Ca orice proteină şi hemoglobina suferă sub acţiunea agenţilor denaturanţi o denaturare a globinei. Complecşii formaţi între hem şi globinele denaturate se încadrează în clasa *hemocromogenilor*.

4.1.2 Mioglobina

Mioglobina este o *cromoproteidă muscular ă similară ca structură şi rol hemoglobinei*. Spre deosebire de aceasta globina prezentă în molecula mioglobinei este alcătuită dintr-un singur lanţ polipetidic care conţine res-

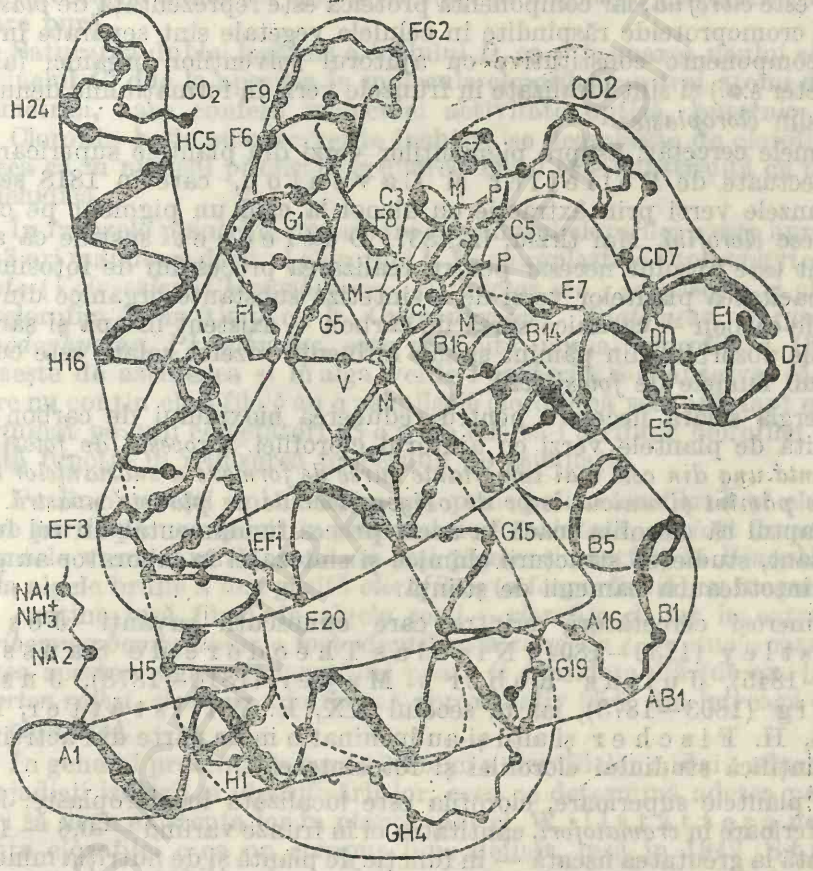


Fig. 4.6. — Reprezentarea schematică a structurii mioglobinei izolată din sperma de caşalot (după D i c k e r s o n). Catena polipeptidică este numerotată de la restul aminoacidului din poziţia N-terminală ; restul de glicină din poziţia 153 este notat cu G. Prescurtările cu o singură literă folosite pentru resturile aminoacizilor sînt plasate în poziţia corespunzătoare atomului de carbon α, în timp ce gruparea hemului este coplanară structurii moleculei de mioglobină. Regiunile moleculei care au o structură în α-helix sînt redate prin linii drepte groase

turile a 153 de aminoacizi şi are o masă moleculară de aproximativ 17 200. Structura terţiară a mioglobinei (fig. 4.6.) a fost stabilită de Kendrew (1960) şi Dickerson (1971).

Mioglobina are o afinitate faţă de oxigen de aproximativ şase ori mai mare decît hemoglobina şi constituie o rezervă de oxigen pentru ţesutul muscular. Muşchii striaţi care efectuează contracţii ritmice de lungă durată, muşchii inimii, muşchii pectorali ai păsărilor zburătoare etc. conţin mari cantităţi de mioglobină.

4.1.3 Cloroplastinele

Cloroplastinele sînt cromoproteide pirolice a căror componentă prostestică este *clorofila*, iar componenta proteică este reprezentată de *plastină*. Aceste cromoproteide răspîndite în celulele vegetale sînt separate în cele două componente constitutive cu ajutorul solvenţilor organici (alcool etilic, eter ş.a.) şi sînt localizate în frunzele verzi în formaţiunile denumite *grana* din *cloroplaste*.

Primele cercetări asupra pigmenţilor verzi din plantele superioare au fost efectuate de Pelletier şi Caventou, care în 1818 separă din frunzele verzi prin extracţie cu alcool la cald un pigment pe care-l denumesc *clorofilă*. Mai tîrziu, în 1837, Dutrochet susţine că acest pigment este absolut necesar pentru realizarea procesului de fotosinteză.

Capacitatea plantelor verzi de a sintetiza substanţe organice din bioxidul de carbon — ca unica sursă de carbon — existent în apă şi sărurile minerale absorbite din pămînt şi sub influenţa razelor solare este cunoscută sub numele de *fotosinteză*.

Energia solară necesară pentru reducerea bioxidului de carbon este absorbită de plantele verzi cu ajutorul clorofilei. *Procesul de fotosinteză reprezintă una din cele mai importante surse de formare a substanţelor organice pe pămînt şi unicul izvor de oxigen liber de pe planeta noastră.* Dat fiind faptul că clorofila joacă în acest proces fundamental un rol foarte important, studierea structurii chimice şi sinteza ei în laborator au preocupat întotdeauna oamenii de ştiinţă.

Numeroşi cercetători, printre care cunoscuţii savanţi Joseph Priestley (1733—1804), Nicolas Théodore de Saussure (1767—1845), Julius Robert Mayer (1814—1878), Justus Liebig (1803—1873), iar în secolul XX, R. Willstätter, M. C. Ţvet, H. Fischer şi alţii şi-au închinat o mare parte din activitatea lor ştiinţifică studiului clorofilei şi fotosintezei.

La plantele superioare, clorofila este localizată în cloroplaste, iar la cele inferioare în *cromatofori*, cantitatea ei în frunze variind — 0,6 — 1,2 %, calculată la greutatea uscată — în funcţie de plantă şi de nutriţia minerală. Pentru formarea clorofilei în frunze sînt necesare microelementele (Fe, Mg etc.), oxigenul şi lumina. Multe plante inferioare şi coniferele sînt însă capabile să sintetizeze mici cantităţi de clorofilă şi în absenţa luminii.

Botanistul rus M. C. Ţvet folosind o metodă cromatografică, a reuşit în 1903 să separe clorofila în două componente: *clorofila a* şi *clorofila b*. Mai tîrziu, Willstätter (1914), pe baza analizelor elementare de

laborator redă formula brută a *clorofilei a* ($C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$), iar în 1940, H. Fischer şi A. Stern stabilesc configuraţia spaţială a moleculei de clorofilă, ulterior unanim recunoscută de toţi cercetătorii. La baza structurii clorofilei se găseşte compusul organic denumit *forbină* (fig. 4.7, a) format din patru nuclee pirolice (I, II, III, IV) legate între ele prin punţi metinice (α, β, γ, δ). *Clorofila a* (fig. 4.7, b), un pigment de culoare albastră-verzuie, reprezintă esterul compus al unui acid bibazic cu doi alcooli — alcoolul metilic şi alcoolul superior nesaturat — *fitolul:*

$$CH_3-CH(CH_3)-(CH_2)_3-CH(CH_3)-(CH_2)_3-CH(CH_3)-(CH_2)_3-C(CH_3)=CH-CH_2OH$$

Prezenţa acestuia în moleculă conferă clorofilei un caracter amorf, ceros, ceea ce aduce cu sine dificultăţi în obţinerea clorofilelor native în stare pură.

Saturarea dublei legături a inelului *D*, ca şi formarea noului ciclu legat de inelul *C*, duc la apariţia în molecula clorofilelor a trei atomi de carbon asimetrici, care conferă moleculei activitate optică, puternic levogiră.

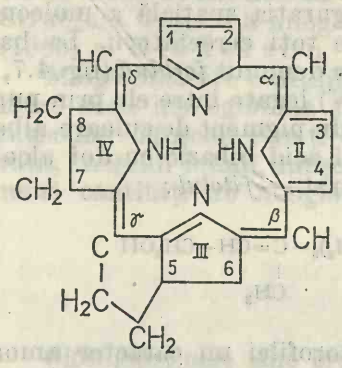
Clorofila *b*, de culoare verde închisă, se deosebeşte de clorofila *a* prin aceea că în nucleul pirolic II gruparea metil este substituită cu o grupare aldehidică.

În frunzele plantelor superioare conţinutul clorofilei *a* este aproximativ de 3 ori mai mare decît al clorofilei *b*. În cloroplastele Cromophytelor autotrofe (*Volvocales, Chlorophyceae, Characeae* etc.) se găseşte şi clorofila *a* şi clorofila *b*, în timp ce la *Cyanophyceae, Diatomeae, Chrysophyceae, Rhodophyceae, Pheophyceae*, este prezentă numai clorofila *a*. Clorofila *b* lipseşte de asemenea şi în alga verde *Vaucheria*. S-a observat că plantele care nu conţin clorofila *b* au o asimilaţie clorofilină scăzută, fapt care a determinat pe unii cercetători (Seybold) să-i atribuie clorofilei *b* o anumită funcţie în realizarea procesului de asimilaţie.

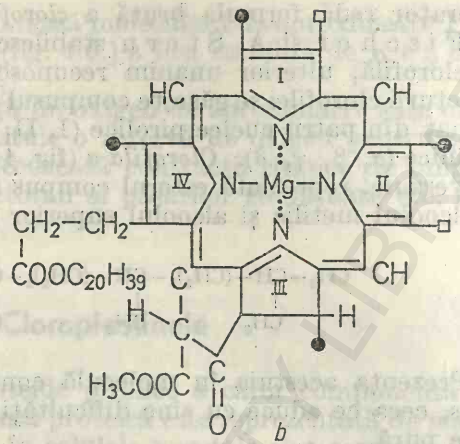
Pe lîngă aceşti doi componenţi principali, clorofila *a* şi clorofila *b*, care participă nemijlocit în procesul de fotosinteză, au fost descoperite în plantele verzi cantităţi mici de alţi pigmenţi. Astfel, la *Dinophlagelateae* şi la algele brune a fost găsită *clorofila c* (o feoporfirină) cu magneziu, care nu conţine însă fitol), în algele roşii — *clorofila d*, iar în extractele de *Tribomma bombycinum* a fost identificată *clorofila e*. În unele cazuri cantitatea acestor pigmenţi însoţitori poate fi considerabilă (de ex. la *Rhodochorton rothii, clorofila d* formează aproximativ 25 % din întreaga cantitate de clorofilă).

În general prezenţa în cantităţi mici a clorofilelor *c, d* şi *e* aduce serioase prejudicii izolării şi identificării lor, ceea ce determină adesea pe cercetători să nege existenţa lor în plante. Astfel, Willstätter a negat existenţa clorofilei *c* ca un compus bine definit, însă în 1942 Strain şi Manning stabilesc în mod convingător prezenţa în plante a acestui izomer al clorofilei.

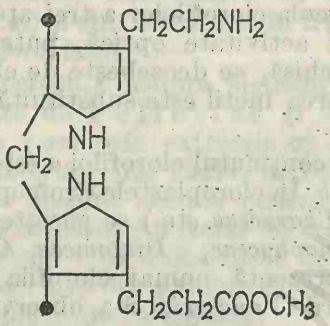
Existenţa acestor pigmenţi în frunzele verzi a ridicat însă problema rolului lor în procesul fotosintezei. Experienţele efectuate pe diferite specii de alge au demonstrat că o parte din energia luminoasă este absorbită de aceşti pigmenţi şi transmisă apoi clorofilei *a*. Astfel, la algele verzi acest



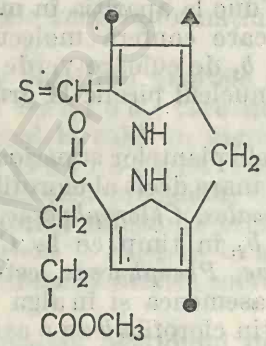
a



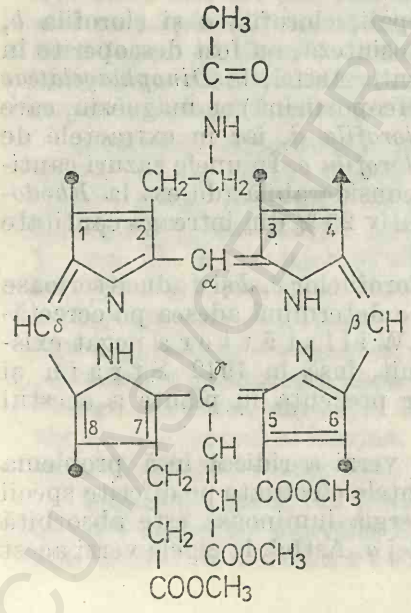
b



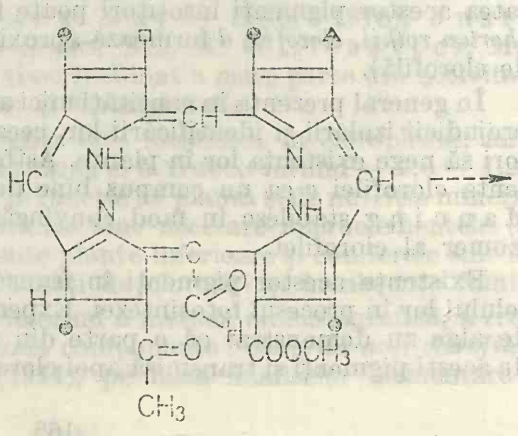
c



d



e



f

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

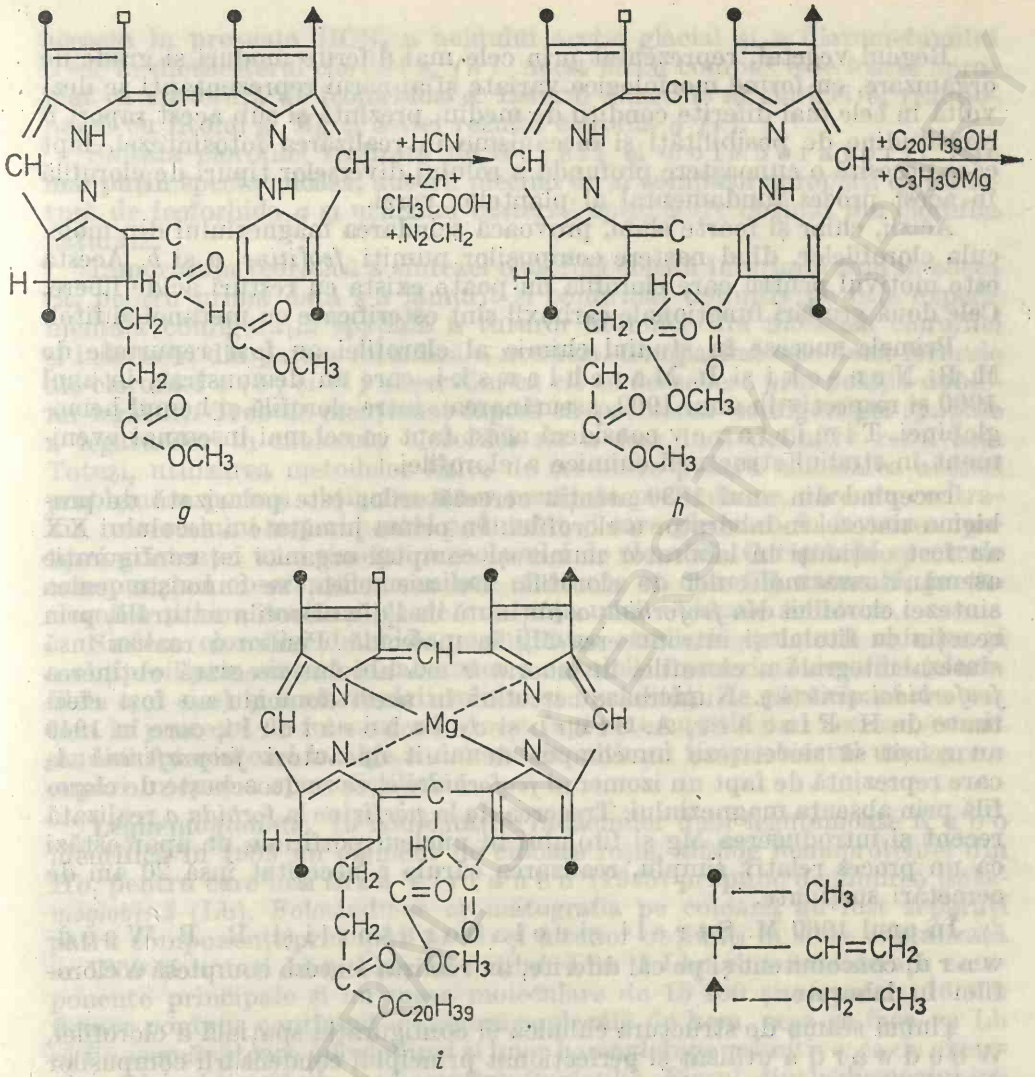


Fig. 4.7. — Structurile chimice ale principalelor componente ale clorofilei și schema sintezei acesteia, după W o o d w a r d.

a — structura forbinei; *b* — structura clorofilei *a*; *c* — 3,3'-dimetil-4-aminoetil-4'-acid propionic dipiridilmetan; *d* — 3,4-dimetil-3-etil-4'-carboximetil-propionil dipirilmetan-5'-tioformil (*c* și *d* sînt compușii inițiali folosiți pentru sinteza nucleului porfirinic); *e,f* — compuși intermediari ai sintezei; *g* — purpurină-5-dimetilester; *h* — dimetilesterul clorinei e_6; *i* — clorofila *a*.

rol este realizat de clorofila *b*, la algele brune de pigmentul denumit *fucoxantină* și de clorofila *c*, iar la bacteriile purpurii o altă grupă de pigmenți — *carotenoizii* — absorb energia luminoasă, transmițînd-o nu clorofilei *a*, ci *bacterioclorofilei*.

Bacterioclorofila este prezentă în *Rhodobaccilus palustris*, de unde a fost extrasă prima dată sub două forme izomere: *bacterioclorofila a* ($C_{55}H_{72}N_4O_5Mg$) și *bacterioclorofila b* ($C_{55}H_{72}N_4O_6MgH_2O$).

Regnul vegetal, reprezentat prin cele mai diferite moduri și grade de organizare, cu forme morfologice variate și ai cărui reprezentanți se dezvoltă în cele mai diferite condiții de mediu, prezintă și sub acest raport o multitudine de posibilități și mecanisme în realizarea fotosintezei, fapt care necesită o cunoaștere profundă a rolului diverselor tipuri de clorofilă în acest proces fundamental al plantelor verzi.

Acizii, chiar și foarte slabi, provoacă scindarea magneziului din molecula clorofilelor, dînd naștere compușilor numiți *feofitine a* și *b*. Acesta este motivul pentru care clorofila nu poate exista cu resturi acide libere. Cele două grupări funcționale carboxil sînt esterificate cu metanol și fitol.

Primele succese în studiul chimic al clorofilei au fost repurtate de M. B. Nenscki și L. Marchlewski, care au demonstrat, în anul 1900 și respectiv în anul 1902, asemănarea între clorofilă și hemul hemoglobinei. Timiriazev consideră acest fapt ca cel mai însemnat eveniment în studiul structurii chimice a clorofilei.

Începînd din anul 1930 atenția cercetătorilor este polarizată de problema sintezei în laborator a clorofilei. În prima jumătate a secolului XX au fost obținuți în laborator numeroși compuși organici cu configurație asemănătoare moleculei de clorofilă. De asemenea, se cunoaște calea sintezei clorofilei din *feoforbida a*, obținută însă din clorofila naturală, prin reacția cu fitolul și introducerea Mg în moleculă. Pentru a realiza însă sinteza integrală a clorofilei în laborator era absolut necesară obținerea *feoforbidei sintetice*. Numeroase cercetări în acest domeniu au fost efectuate de H. Fischer, A. Stern și colaboratorii, care în 1940 au reușit să sintetizeze un compus denumit de autori *feoporfirină* A_5 care reprezintă de fapt un izomer al *feoforbidei a*, ce se deosebește de clorofilă prin absența magneziului. Trecerea de la *porfirine* la *forbida a* realizată recent și introducerea Mg și fitolului în nucleul porfirinic ne apar astăzi ca un proces relativ simplu, realizarea căruia a necesitat însă 20 ani de cercetări susținute.

În anul 1960 M. Strell și colaboratorii și R. B. Woodward, concomitent și pe căi diferite, au realizat sinteza completă a clorofilei în laborator.

Ținînd seama de structura chimică și configurația spațială a clorofilei, Woodward a utilizat și perfecționat principiul condensării compușilor dipirilmetanici într-un sistem de tipul *porfirinelor*, folosind în acest scop compuși inițiali relativ simpli și apropiați, în ce privește configurația, de nucleul porfirinic (fig. 4.7 *c. d.*).

Sinteza nucleului porfirinic se realizează în decursul a numeroase reacții de reducere și oxidare în diferite medii de reacție și în prezența de catalizatori. În anumite etape, mediul de reacție trebuie să fie puternic oxidant, în caz contrar obținîndu-se nu porfirine, ci *hidroporfirine*.

Realizarea cea mai importantă a fost trecerea de la porfirine la forbidă, ceea ce pînă în ultimii ani nu s-a putut realiza. Etapele principale ale acestei sinteze sînt reprezentate schematic (fig. 4.7, *e—i*).

Pornind de la ciclul porfirinic (*e*) Woodward obține cu ajutorul unor reacții intermediare, care au loc la nivelul punții metinice (—CH=) și în poziția 7 un compus denumit *purpurină-5, 7-dimetilester* (*g*), care prin tratare cu acid cianhidric este transformat într-o cianolactonă, iar

aceasta în prezența HCN, a acidului acetic glacial și a diazometanului trece în dietilesterul *clorinei* e_6 *(h)*. Acest ultim compus este foarte apropiat ca structură de feoforbida *a*. Esterul dimetilic al clorinei e_6 reacționează cu fitolul și Mg și astfel rezultă clorofila *a (i)*.

Sinteza clorofilei realizată de Strell și colaboratorii este mai puțin spectaculoasă, autorii plecînd de la compușii apropiați ca structură de feoforbida *a* și utilizînd material optic activ obținut din clorofila naturală.

Importanța teoretică a sintezei clorofilei constă în primul rînd în aceea că, pentru prima dată s-a lămurit și confirmat definitiv pe cale experimentală configurația spațială a tuturor atomilor din molecula clorofilei și îndeosebi din partea forbidică a acesteia. Comparînd cele două formule ale clorofilei *a (b)* și *(i)* observăm că ele se deosebesc prin poziția dublelor legături. Trebuie menționat faptul că problema configurației spațiale a legăturilor în molecula clorofilei nu a fost încă definitiv rezolvată. Totuși, utilizarea metodelor fizice de cercetare pentru elucidarea acestei probleme a permis obținerea unor rezultate preliminare, care nu contravin materialului experimental acumulat și care pledează în favoarea ipotezei existenței unei simetrii a moleculei de clorofilă. Cercetările spectrale corespunzînd observațiilor similare efectuate cu clorofilă naturală, protoclorofilă și hem confirmă și ele existența unei molecule simetrice.

Sinteza clorofilei deschide posibilitatea studierii structurii chimice și a obținerii prin sinteză în laborator a celorlalți izomeri ai clorofilei (clorofilele *c*, *d* și *e*) și a clarificării rolului și modalității de participare a acestora în procesul de fotosinteză. Acest fapt este cu atît mai necesar, cu cît studiul fotosintezei la alge a devenit în ultimul timp obiectul unei preocupări intense a specialiștilor.

Leghemoglobina. În nodozitățile rădăcinilor unor leguminoase Kubo identifică în 1939 un pigment de culoare roșie, analog hemoproteinei din Hb, pentru care mai tîrziu Virtanen (1945) propune denumirea *leghemoglobină* (Lb). Folosindu-se cromatografia pe coloană au fost separați patru componenți principali ai Lb și ulterior obținuți în stare cristalizată în 1959 și notați Lb*a*, Lb*b*, Lb*c*, Lb*d*. Lb*a* și Lb*c* sînt considerate componente principale și au mase moleculare de 15 400 și respectiv 16 800 fiecare compus conținînd o singură moleculă de hem, ceea ce face ca Lb să fie asemănătoare mioglobinei și unor hemoglobine primitive, ca de exemplu, celei obținută de la *Lampetra fluviatilis*. Fierul din leghemoglobină este legat de partea proteică într-un mod asemănător hemoglobinei.

Secvența aminoacizilor din leghemoglobina izolată din soia, după Ellfolk (1971) este redată în figura 4.8.

Lb*a* și Lb*c* conțin catene polipeptidice alcătuite din aproximativ 140 de resturi de aminoacizi. Spre deosebire de hemoglobine Lb nu conține aminoacizi cu sulf și are un conținut scăzut în histidină (numai două resturi de *His* per moleculă). Cele două resturi de *His* sînt situate în pozițiile 61 și 92 ale catenei polipeptidice, fiind separate de 31 resturi de aminoacizi, și se presupune că ele fac legătura între hem și catena polipeptidică, care spre deosebire de cea a vertebratelor nu are proprietăți bazice.

Ellfolk (1971) presupune că molecula de Lb*a* este pliată în același fel ca și globina vertebratelor, deoarece toate cele cinci resturi de prolină sînt situate la extremitatea punctelor unde, de regulă, catena globinelor

este curbată : restul de *Pro 23* corepunde începutului elicei *B* din catena globulinelor, *Pro 38* — elicei *C*, Pro 50 — elicei *D* şi *Pro 56* — elicei *E* şi *Pro 100* ar corespunde elicei *G* (fig. 4.8). Hemul este situat, de regulă,

1 10 20
Val-Ala-Phe-Thr-Glu-Lys-Gln-Asp-Ala-Leu-Val-Ser-Ser-Ser-Phe-Glu-Ala-Phe-Lys-Ala-Asn-Ile-
30 40
-Pro-Gln-Tyr-Ser-Val-Val-Phe-Tyr-Thr-Ser-Ile-Leu-Glu-Lys-Ala-Pro-Ala-Ala-Lys-Asp-Leu-Phe-
50 60
-Ser-Phe-Leu-Ala-Asn-Pro-Thr-Asp-Gly-Val-Asn-Pro-Lys-Leu-Thr-Gly-His-Ala-Glu-Lys-Leu-
70 80
-Phe-Ala-Leu-Val-Arg-Asp-Ser-Ala-Gly-Gln-Leu-Lys-Ala-Ser-Gly-Thr-Val-Val-Ala-Asp-Ala-
90 100
-Ala-Leu-Gly-Ser-Val-His-Ala-Gln-Lys-Ala-Val-Thr-Asn-Pro-Glu-Phe-Val-Val-Lys-Glu-Ala-
110 120
-Leu-Leu-Lys-Thr-Ile-Lys-Ala-Ala-Val-Gly-Asp-Lys-Trp-Ser-Asp-Glu-Leu-Ser-Arg-Ala-Trp-
130 140
-Glu-Val-Ala-Tyr-Glu-Leu-Ala-Ala-Ile-Lys-Ala-Lys.

Fig. 4.8. — Structura primară a leghemoglobinei, izolată din semințele de soia.

într-o „cavitate" înconjurată de aminoacizi nepolari, deoarece hidrofobicitatea acestei regiuni joacă un rol important în fixarea reversibilă a oxigenului.

Lb poate fi sintetizată numai cînd planta şi bacteroizii trăiesc în simbioză. Cutting şi Schulman (1969) au arătat că sinteza hemului se realizează în bacteroizii din nodozităţile rădăcinilor în proporţie de 70—80% în timp ce sinteza proteinei din Lb are loc în întregime în citoplasma celulelor plantei, unde numărul ribozomilor este foarte mare. Aceiaşi autori (1971) au precizat că structura primară a Lb este determinată de genomul plantelor chiar dacă sinteza nu are loc în celule decît în timpul simbiozei. Se presupune că sinteza hemului este iniţiată de către bacteroizi.

În prezent, nu există dovezi experimentale certe care să ateste faptul că Lb activează oxigenul molecular sau că funcţionează ca un transportor de azot. Bergersen (1960) a emis ipoteza că enzima care fixează azotul este localizată la exteriorul bacteroizilor şi că Lb funcţionează ca un sistem redox între bacteroizi şi azotul molecular. Deoarece ulterior s-a demonstrat că fixarea azotului se face în interiorul bacteroizilor este cert faptul că Lb nu are un rol primar în fixarea azotului.

În anul 1969 Appelby a demonstrat că bacteriile *Rhizobium* în stare liberă, adică în afara nodozităţilor din rădăcinile leguminoaselor, au hemoglobina lor proprie, care după probele serologice pare să fie diferită de leghemoglobină.

4.1.4 Citocromii

Printre cromoproteidele care conţin ca grupare prostetică hemina se numără şi *citocromii* descoperiţi de Keilin (1925).

Citocromii sînt hemoproteide care *participă la reacţiile de transfer a electronilor*, modificările reversibile în starea lor de oxidare înregistrîndu-se

la nivelul grupării prostetice. Ei sînt prezenți la bacteriile brune fotosintetizante, în levuri, la microorganisme, în țesuturile plantelor nefotosintetizante, în cloroplaste, mitocondriile eucariotelor, în microsomii celulelor animale etc. și îndeplinesc un rol important în respirația celulară datorită schimbării treptelor de valență ale atomului de fier.

Citocromii au proprietatea de a absorbi radiațiile luminoase de diferite lungimi de undă și după dispoziția benzilor de absorbție au fost clasificați în *citocromi a, b, c* și *d*. Această împărțire a citocromilor se bazează pe natura grupării prostetice și a legăturilor existente între aceasta și componenta proteică. Citocromii *a* conțin ca grupare prostetică hemul care prezintă catene laterale de formil (hem *a*), citocromii *b* conțin protohem (adică hem fără grupări formil) care nu este legat covalent de proteină, în timp ce citocromii *c* au gruparea prostetică — hemul — legat covalent de componenta proteică (dar nu prin intermediul unor legături covalente tioester). În cea de a patra categorie — citocromii *d* — conțin ca grupare prostetică chelatul tetrapirolic al fierului sub formă de dihidroporfirină. Ulterior, au devenit necesare subîmpărțiri în cadrul primelor trei grupe, deoarece cercetările spectroscopice au evidențiat deosebiri importante între diferiții reprezentanți ai aceleiași grupe condiționate, probabil, fie de partea proteică cu caracter bazic a moleculei lor, fie de numărul și de modul de legare a grupărilor prostetice.

Cînd citocromul conține două sau mai multe grupări prostetice din care unele sînt legate de proteina specifică prin legături covalente, iar altele sînt atașate prin legături necovalente atunci citocromul este desemnat prin două litere de exemplu, citocrom *aa'*. Același principiu se aplică și în cazul citocromilor care conțin grupări prostetice suplimentare, cum este cazul citocromului aa_3 care conține Cu sau a citocromului b_2 care conține flavinmononucleotid, dar în această situație se folosesc infraindicii. Ordonarea citocromilor în interiorul unei grupe se face în funcție de structura lor, de proprietățile fizico-chimice și mai ales de poziția benzii de absorbție (în nm) a formelor reduse *. De exemplu, citocromii din grupa *c* sînt divizați în:

— *citocrom c*, prezent în mitocondriile eucariotelor, are un *p*H izoelectric de 7 și oxidarea formei fero de către oxigen este catalizată de citocrom-*c*-oxidază; benzile de absorbție specifică ale formei fero sînt (α) 550 nm; (β) 520 nm și (γ) 415 nm;

— *citocrom* c_1, prezent în mitocondriile eucariotelor are banda de absorbție specifică α la 553 nm;

— *citocrom* c_2, prezent la bacteriile sintetizante nesulfuroase, este solubil și conține o singură grupare prostetică cuplată cu proteina specifică prin intermediul unei legături tioester; reacția de oxidare în prezența citocrom-*c*-oxidazei este extrem de slabă sau absentă;

— *citocrom* c_3 răspîndit la bacteriile reducătoare de sulfat, bacteriile fotosintetizante și la algele brun-albastre este un citocrom care conține una sau mai multe grupări prostetice și are un potențial redox scăzut (fig. 4.9);

---

* În stare redusă fiecare tip de citocrom posedă trei benzi de absorbție distincte în regiunea vizibilă a spectrului α, β și γ, denumite și *benzi* Soret.

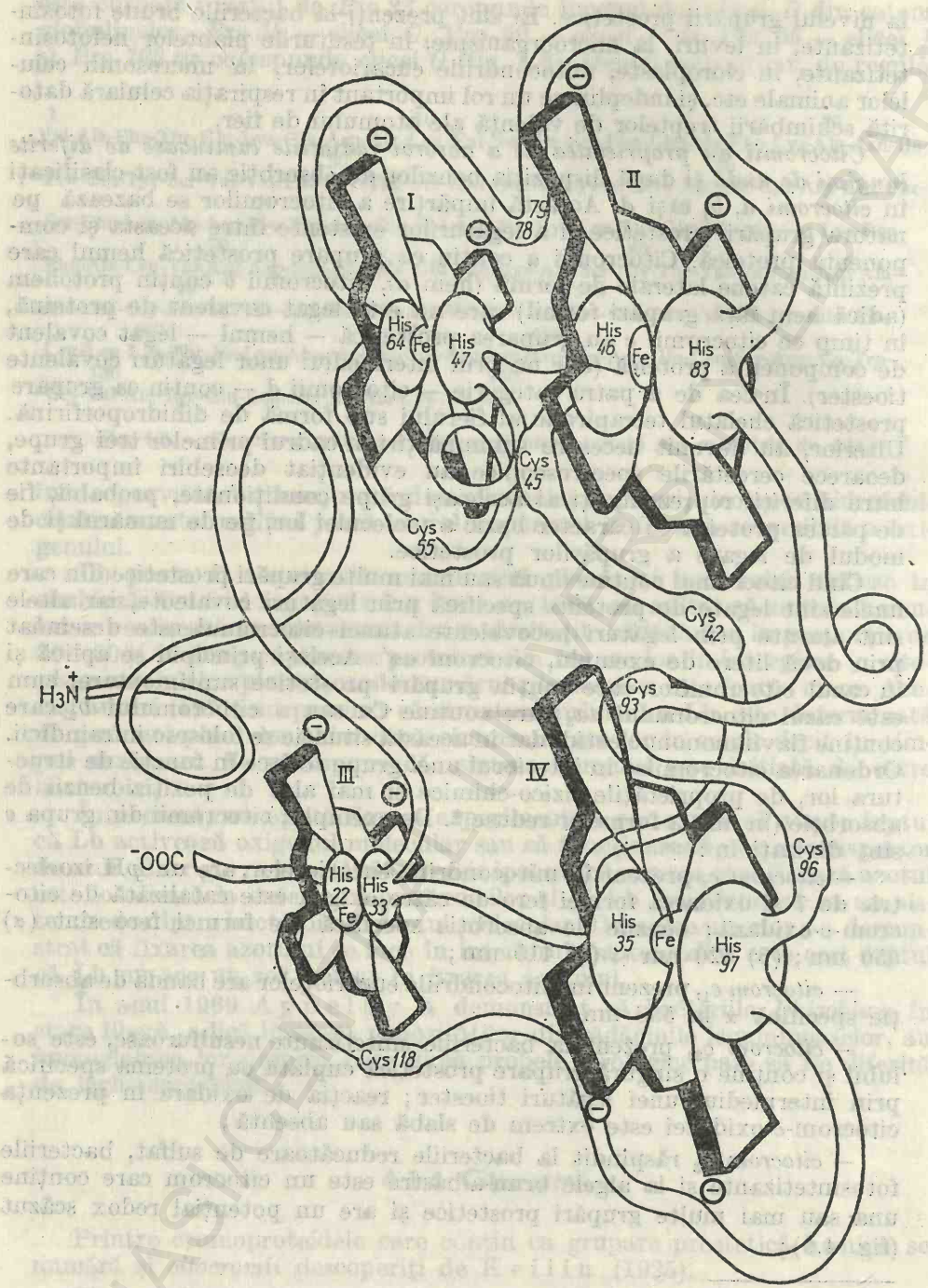


Fig. 4.9. — Schița structurii terțiare a citocromului c_3 și modul de legare al grupărilor prostetice.

— *citocrom* c_6, denumit și *citocrom f*, este un tip de citocrom cu un potențial redox ridicat și se întîlnește în cloroplaste și în membranele plantelor fotosintetizante;

— *citocrom c'* nu este de fapt un tip de citocrom *c* ci mai degrabă o clasă de diferiți citocromi *c* care conțin gruparea prostetică legată la proteina specifică prin intermediul unei legături covalente tioester; acest tip de citocromi a fost izolat de la bacteriile brune fotosintetizante și de la *Alcaligenes species* care este capabil să reducă nitratul (A m b l e r, 1973).

Din categoria citocromilor *c* fac parte, de asemenea, citocromii izolați de la diferite bacterii, de exemplu, citocromii de la *Azotobacter vinelandi*, *citocrom* c_4 și c_5, *citocromii* c_{551}, care conțin grupări prostetice sub formă de monohem sau multihem, *citocromii* c_{555}, c_{553}, c_{556}, separați de la *Chromatium*, *Chlorobium*, *Tetrahymena pyriformis*, *Euglena gracilis* și *Crithidia oncopelti* (V a n B e e u m e n și alții, 1976), C a m p b e l l și a l ț i i (1973), T a r r și F i t c h (1976), P e t t i g r e w și a l ț i i (1975).

Înrudirea structurală și comparația dintre rolul fiziologic al citocromilor și a altor cromoproteide sînt redate sintetic în tabelul 4.2.

Cel mai bine studiat pînă în prezent, deoarece este solubil și ușor de preparat, este citocromul *c*, substanță diamagnetică, care realizează transportul de electroni de la o flavinenzimă sau de la o chinonă la citocromoxidază. Citocromul *c* este o hemoproteidă cu o masă moleculară de aproximativ 12 000—13 000, care conține în molecula sa o grupare cromoforă derivată de la *protoporfirină*. Între inelul porfirinic al hemului și partea proteică există două legături covalente formate de resturile de cisteină prin intermediul grupărilor SH și resturile vinil ale hemului; aceste două legături tioeterice nu pot fi distruse prin hidroliză. Așezarea spațială a celor două resturi de cisteină este realizată în așa fel încît acestea se găsesc într-o regiune de α-helix a proteinei și învecinate cu resturile de His, pretîndu-se astfel la satisfacerea unei valențe coordinative a atomului de fier. Studiile de difracție de raze X ale structurii cristalelor de citocrom *c* au arătat că hemul este dispus în așa fel în interiorul părții proteice încît se găsește situat într-o cavitate hidrofobică, aproape complet acoperit de proteină și nu poate reacționa cu O_2, CN sau cu CO la valori de *p*H neutre din care cauză nu poate fi „intoxicat" de inhibitorii săi obișnuiți. Studiile întreprinse de T h e o r e l l, M a r g o l i a s h și T u p p y au arătat că în cazul citocromului *c* cele două resturi cisteinil legate de hem se găsesc în pozițiile 14 și 17, deci foarte aproape de extremitatea N-terminală a catenei polipeptidice.

Structura primară a componentei de natură proteică a citocromilor *c* izolați de la dicotiledonate *(Sesamum indicum, Ricinus communis* și *Phaseolus aureus)* constă din 111 resturi de aminoacizi, ceea ce demonstrează înrudirea lor cu citocromul *c* de tip mitocondrial. Toate moleculele acestor citocromi au la extremitatea N-terminală o secvență comună alcătuită din opt resturi de aminoacizi, iar restul aminoacidului N-terminal — *Ala* — este întotdeauna acetilat; în pozițiile 72 și 86 în toate moleculele de citocrom *c* se găsesc resturile unui aminoacid neobișnuit E-N-trimetillizina, specifice pentru citocromii *c* de origine vegetală. Din structurile primare ale acestor citocromi, redate în figura 4.10, se observă diferențe neesențiale în compoziția în aminoacizi și în ordinea în care aceștia se succed. Comparația structurii primare a citocromilor *c* izolați de la reprezentanți ai clasei

TABELUL 4.2

Înrudirea structurală și clasificarea funcțională comparativă a citocromilor și a unor cromoproteide *

Compusul și starea de oxidare a fierului din gruparea prostetică	*Masa moleculară*	*Structura nucleului porfirinic și natura substituenților din pozițiile*** 2	4	8	*Natura legăturii dintre porfirină și partea proteică*	*Funcția biologică*
Hemoglobina (Fe^{2+})	65 000	V	V	Me	Necovalentă	Transportă O_2
Mioglobina	17 000	V	V	Me	Necovalentă	Transportă O_2
Citocrom *a* ($Fe^{2+} \rightleftarrows Fe^{3+}$)	70 000	X	V	Me	Necovalentă	Transportă electronii și participă la reacții redox
Citocrom *b* ($Fe^{2+} \rightleftarrows Fe^{3+}$)	30 000—170 000	V	V	Me	Necovalentă	,, ,,
Citocrom *c* ($Fe^{2+} \rightleftarrows Fe^{3+}$)	13 000— 35 000	E(V)	E(V)	Me	Covalentă	,, ,,
Catalaze (Fe^{3+})	220 000—250 000	V	V	Me	Necovalentă	$_2H_2O_2 \rightarrow {}_2H_2O + 1/2\ O_2$
Peroxidaze	50 000	V	V	Me	Necovalentă și covalentă	$H_2O_2 + AH_2 \rightarrow 2H_2O + A$

* Alte proprietăți ale citocromilor vezi capitolul 11.

** V = radical vinil; Me = radical metil; E = radical etil $-CH_2-CH_3$ (S-Proteină); X = radical $-CHOH-CH_2(CH_2-CH_2-CH(CH_3)-CH_2)_3\cdot H$

Porfirina cu Fe^{2+} formează hemul iar cu Fe^{3+} formează hemina.

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITARA CAROL I LIBRARY

cotiledonatelor cu cea a citocromului *c* separat din cariopsele de grîu (reprezentant al clasei monocotiledonatelor) conduce la ipoteza existenţei unui strămoş comun al plantelor superioare. După Thompson (1972)

```
                    -8          (Ser)                +1
(1) SUSAN :  Acetil-Ala-Ser-Phe-Asx-Glx-Ala-Pro-Pro-Gly-Asx
(2) RICIN :  Acetil-Ala-Ser-Phe-Asx-Glx-Ala-Pro-Pro-Gly-Asx-
(3) FASOLE : Acetil-Ala-Ser-Phe-Asx-Glx-Ala-Pro-Pro-Gly-Asx-

                                10
(1) : -Val-Lys-Ser-Gly-Glu-Lys-Ile-Phe-Lys-Thr-Lys-Cys-Ala-
(2) : -Val-Lys-Ala-Gly-Glu-Lys-Ile-Phe-Lys-Thr-Lys-Cys-Ala-
(3) : -Ser-Lys-Ser-Gly-Glu-Lys-Ile-Phe-Lys-Thr-Lys-Cys-Ala-

                    20
(1) : -Gln-Cys-His-Thr-Val-Asp-Lys-Gly-Ala-Gly-His-Lys-Gln-
(2) : -Gln-Cys-His-Thr-Val-Glu-Lys-Gly-Ala-Gly-His-Lys-Gln-
(3) : -Gln-Cys-His-Thr-Val-Asp-Lys-Gly-Ala-Gly-His-Lys-Gln-

        30                                          40
(1) : -Gly-Pro-Asn-Leu-Asn-Gly-Leu-Phe-Gly-Arg-Gln-Ser-Gly-
(2) : -Gly-Pro-Asn-Leu-Asn-Gly-Leu-Phe-Gly-Arg-Gln-Ser-Gly-
(3) : -Gly-Pro-Asn-Leu-Asn-Gly-Leu-Phe-Gly-Arg-Gln-Ser-Gly-

                                    50
(1) : -Thr-Thr-Pro-Gly-Tyr-Ser-Tyr-Ser-Ala-Ala-Asn-Lys-Asn-
(2) : -Thr-Thr-Ala-Gly-Tyr-Ser-Tyr-Ser-Ala-Ala-Asn-Lys-Asn-
(3) : -Thr-Thr-Ala-Gly-Tyr-Ser-Tyr-Ser-Thr-Ala-Asn-Lys-Asn-

                        60
(1) : -Met-Ala-Val-Ile-Trp-Gly-Glu-Asn-Thr-Leu-Tyr-Asp-Tyr-
(2) : -Met-Ala-Val-Gln-Trp-Gly-Glu-Asn-Thr-Leu-Tyr-Asp-Tyr-
(3) : -Met-Ala-Val-Ile-Trp-Glu-Glu-Lys-Thr-Leu-Tyr-Asp-Tyr-

            70      72                                  80
(1) : -Leu-Leu-Asn-Pro-TML-Lys-Tyr-Ile-Pro-Gly-Thr-Lys-Met-
(2) : -Leu-Leu-Asn-Pro-TML-Lys-Tyr-Ile-Pro-Gly-Thr-Lys-Met-
(3) : -Leu-Leu-Asn-Pro-TML-Lys-Tyr-Ile-Pro-Gly-Thr-Lys-Met-

                        86                  90
(1) : -Val-Phe-Pro-Gly-Leu-TML-Lys-Pro-Gln-Glu Arg-Ala-Asp-
(2) : -Val-Phe-Pro-Gly-Leu-TML-Lys-Pro-Gln-Asp-Arg-Ala-Asp-
(3) : -Val-Phe-Pro-Gly-Leu-TML-Lys-Pro-Gln-Asp-Arg-Ala-Asp-

                        100         103
(1) : -Leu-Ile-Ala-Tyr-Ser-Lys-Glu-Ala-Thr-Ala-COOH
(2) : -Leu-Ile-Ala-Tyr-Ser-Lys-Glu/Gln-Ala-Thr-Ala-COOH
(3) : -Leu-Ile-Ala-Tyr-Ser-Lys-Glu-Ser-Thr-Ala-COOH
```

Fig. 4.10.—Secvenţa completă a aminoacizilor citocromilor *c* izolaţi din susan, ricin şi fasole, după Thompson (1972).

secvenţa primară a componentei proteice a citocromilor poate servi drept criteriu biochimic în clasificarea plantelor.

Ramskaw (1974) stabileşte secvenţa primară a citocromului *c* izolat de la un reprezentant al gimnospermelor — *Ginkgo biloba* — şi demonstrează că molecula lui este alcătuită din 113 resturi de aminoacizi, prezentînd la extremitatea N-terminală o octapeptidă acetilată, iar în

poziţiile 80 şi 94 două resturi de trimetil lizină. Sub raportul succesiunii aminoacizilor citocromul *c* de la *Ginkgo biloba* este omolog citocromilor mitocondriali, deoarece din cele 35 resturi de aminoacizi invariabili în poziţiile lor în citocromii mitocondriali 34 de poziţii sînt aceleaşi şi în molecula citocromului *c* de la *Ginkgo biloba*. Resturile de trimetillizină sînt componente obişnuite în molecula citocromilor vegetali, dar lipsesc în citocromii nevertebratelor şi vertebratelor. Un exemplu ilustrativ îl constituie citocromul *c* izolat de la melcul de grădină *(Helix aspersa,* M ü l l e r) alcătuit din 104 resturi de aminoacizi şi cu aminoacidul de la extremitatea N-terminală liber, neacetilat. Dintre citocromii izolaţi de la vertebrate cel mai bine studiat este citocromul *c* separat din inima de cal, a cărui secvenţă primară a fost stabilită de M a r g o l i a s h în 1961. Acest citocrom *c*, alcătuit din 104 resturi de aminoacizi şi cu o masă moleculară de 12 400 prezintă mai multe particularităţi:

— aminoacidul N-terminal este acetilat;

— resturile acide care nu se găsesc sub formă de amide au tendinţa de a se grupa în moleculă, de exemplu, Asp-Val-Gly; Glu-Glu; Glu-Tyr-Leu-Glu sau Glu-Arg-Glu-Asp;

— resturile aminoacizilor bazici sînt grupate în diferite regiuni mici ale catenei polipeptidice;

— resturile aminoacizilor hidrofobi sînt, de asemenea, grupate, de exemplu, Leu-Ile-Phe-Tyr-Tyr.

În figura 4.11 redăm secvenţa primară a catenelor polipeptidice ale citocromilor *c* separaţi din *Ginkgo biloba* de la melcul de grădină, din inima de cal şi din inima de om.

Din datele prezentate în figurile 4.10 şi 4.11 reiese că un mare număr de resturi de aminoacizi din moleculele citocromilor este constant, ceea ce sugerează posibilitatea elaborării unei metode biochimice cantitative pentru aprecierea relaţiilor evolutive dintre specii. O tentativă pentru construirea unui arbore filogenetic al plantelor şi animalelor, folosindu-se secvenţele aminoacizilor din citocromii *c*, este redată în figura 4.12. Pentru construirea arborelui filogenetic s-a folosit metoda secvenţei-strămoş (D a y h o f f, 1973).

Punctul de divergenţă a liniei coborîtoare de la *Ginkgo* este situat între punctul de divergenţă din interiorul încrengăturii angiospermelor şi punctul de divergenţă a regnului vegetal, ceea ce este în concordanţă cu faptul că această plantă fosilă — *Ginkgo* — a suferit schimbări morfologice neînsemnate în ultimii 150 milioane de ani.

Stabilirea arborelui filogenetic se bazează astfel pe reconstituirea celei mai probabile secvenţe a proteinei în fiecare punct de divergenţă filogenetică. Timpul scurs devine astfel principalul factor în acumularea diferenţelor în structurile citocromilor *c* şi este independent de raportul modificărilor morfologice. Pentru citocromul *c* s-a calculat că *o unitate a perioadei de evoluţie* este de 26,2 milioane de ani, adică timpul necesar pentru o substituire a unui rest de aminoacid cu un rest al altui aminoacid, între două linii descendente. Pentru fiecare substituire găsită de-a lungul unei singure linii descendente de pe arborele genealogic astfel construit va corespunde o valoare a timpului aproximativ dublă. Astfel, numărul mediu al substituirilor aminoacizilor între Ginkgo şi angiosperme

```
                                  1                 5
Inimă de om   (A) Acetil-Gly-Asp-Val-Glu-Lys-Gly-Lys-Lys-Ile-
Inimă de cal  (B) Acetil-Gly-Asp-Val-Glu-Lys-Gly-Lys-Lys-Ile-
Melc          (C)          Gly-Glx-Ala-Glx-Lys-Gly-Lys-Lys-Ile-
Ginkgo        (D) Acetil-Ala-Thr-Phe-Ser-Glu-Ala-Pro-Pro-Gly-

      10                  15                  20
(A) -Phe-Ile-Met-Lys-Cys-Ser-Gln-Cys-His-Thr-Val-Glu-Lys-Gly-
(B) -Phe-Val-Glu-Lys-Cys-Ala-Glu-Cys-His-Thr-Val-Glu-Lys-Gly-
(C) -Phe-Thr-Gln-Lys-Cys-Leu-Gln-Cys-His-Thr-Val-Glu-Ala-Gly-
(D) -Asp-Pro-Lys-Ala-Gly-Glu-Lys-Ile-Phe-Lys-Thr-Lys-Cys-Ala-

          25                  30                  35
(A) -Gly-Lys-His-Lys-Thr-Gly-Pro-Asn-Leu-His-Gly-Leu-Phe-Gly-
(B) -Gly-Lys-His-Lys-Thr-Gly-Pro-Asp-Leu-His-Gly-Leu-Phe-Gly-
(C) -Gly-Lys-His-Lys-Thr-Gly-Pro-Asn-Leu-Ser-Gly-Leu-Phe-Gly-
(D) -Glx-Cys-His-Thr-Val-Glx-Lys-Gly-Ala-Gly-His-Lys-Gln-Gly-

                40                  45                  50
(A) -Arg-Lys-Thr-Gly-Gln-Ala-Pro-Gly-Tyr-Ser-Tyr-Thr-Ala-Ala-
(B) -Arg-Lys-Thr-Gly-Glu-Ala-Pro-Gly-The-Thr-Tyr-Thr-Asp-Ala-
(C) -Arg-Lys-Gln-Gly-Gln-Ala-Pro-Gly-Phe-Ala-Tyr-Thr-Asp-Ala-
(D) -Pro-Asn-Leu-His-Gly-Leu-Phe-Gly-Arg-Gln-Ser-Gly-Thr-Thr-

                    55                  60                  65
(A) -Asn-Lys-Asn-Lys-Gly-Ile-Ile-Trp-Gly-Glu-Asp-Thr-Leu-Met-
(B) -Asp-Lys-Asp-Lys-Gly-Ile-Thr-Tyr-Lys-Glu-Glu-Thr-Leu-Met-
(C) -Asn-Lys-Gly-Lys-Gly-Ile-Thr-Tyr-Lys-Asn-Gln-Thr-Leu-Phe-
(D) -Ala-Gly-Tyr-Ser-Tyr-Ser-Thr-Gly-Asn-Lys-Asn-Lys-Ala-Val-

                        70                  75
(A) -Glu-Tyr-Leu-Glu-Asn-Pro-Lys-Lys-Tyr-Ile-Pro-Gly-Thr-Lys-
(B) -Glu-Tyr-Leu-Glu-Asp-Pro-Lys-Lys-Tyr-Ile-Pro-Gly-Thr-Lys-
(C) -Glu-Tyr-Leu-Glu-Asn-Pro-Lys-Lys-Tyr-Ile-Pro-Gly-Thr-Lys-
(D) -Asn-Trp-Gly-Glx-Glx-Thr-Leu-Tyr-Glu-Tyr-Leu-Leu-Asn-Pro-

      80                  85                  90
(A) -Met-Ile-Phe-Val-Gly-Ile-Lys-Lys-Lys-Glu-Glu-Arg-Ala-Asp-
(B) -Met-Ile-Phe-Ala-Gly-Ile-Lys-Lys-Lys-Thr-Glu-Arg-Glu-Asp-
(C) -Met-Val-Phe-Ala-Gly-Leu-Lys-Asx-Glx-Thr-Glu-Arg-Val-His-
(D) -Lys-Lys-Tyr-Ile-Pro-Gly-Thr-Lys-Met-Val-Phe-Pro-Gly-Leu-

          95                  100                 104
(A) -Leu-Ile-Ala-Tyr-Leu-Lys-Lys-Ala-Thr-Asn-Glu
(B) -Leu-Ile-Ala-Tyr-Leu-Lys-Lys-Ala-Thr-Asp-Glu
(C) -Leu-Ile-Ala-Tyr-Leu-Glx-Glx-Ala-Thr-Lys-Lys
(D) -Lys-Lys-Pro-Glx-Glx-Arg-Ala-Asp-Leu-Ile-Ser-Tyr-Leu-Lys-
                                                    105
(A)
(B)
(C)
(D) -Gln-Ala-Thr-Ser-Gln-Glu
              110         113
```

Fig. 4.11. — Structura primară comparativă a componentei proteice a citocromilor *c* izolaţi din inimă de om, de cal, din melcul de grădină *(Helix aspersa*, Müller) şi din *Ginkgo biloba* (adaptate după datele lui Ramshaw, Richardson şi Boutler (1964), Margoliash (1961), Brown-Boutler (1970) şi Matsubara şi Smith (1962).

este de 18,4, iar timpul divergenței dintre liniile ce conduc spre Ginkgo biloba și angiosperme variază între 450 și 500 milioane de ani (v. fig. 4.12).

Pentru studiul raporturilor evolutive dintre specii au fost utilizate și alte metode bazate pe similitudinea macromoleculelor de DNA, pe speci-

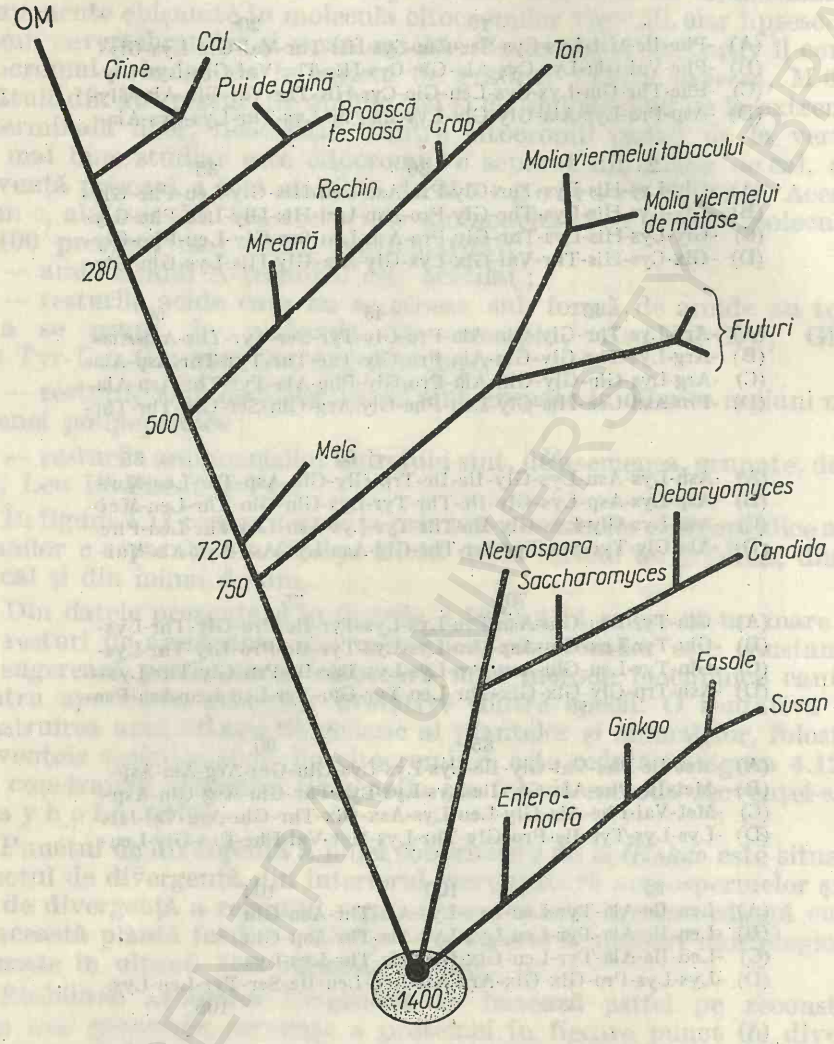


Fig. 4.12. — Tentativă de construire a unui arbore filogenetic al plantelor și animalelor folosindu-se structurile primare ale citocromilor c (după D a y h o f f, 1973)

ficitatea aminoacil-RNA sintetazei, precum și pe alte criterii biochimice (structura chimică a sterolilor, studiul comparat al proteinelor omoloage etc.).

5

NUCLEOPROTEIDE. NUCLEOTIDE. POLINUCLEOTIDE. ACIZII NUCLEICI

Nucleoproteidele sînt heteroproteide alcătuite dintr-o componentă de natură proteică cu proprietăţi bazice, masă moleculară relativ mică şi o *grupare prostetică* reprezentată prin acizii nucleici : *acidul deoxiribonucleic (DNA)* şi *acidul ribonucleic (RNA). Componenta* de natură *proteică* în cele mai multe cazuri face parte din grupa *protaminelor şi histonelor* şi caracterul ei bazic este asigurat cu preponderenţă de prezenţa în structura ei a aminoacizilor diaminomonocarboxilici *Arg* şi *Lys*, şi *His*. În unele cazuri componenta cu proprietăţi bazice din complexul pe care-l formează acidul nucleic este o substanţă relativ simplă, *spermina, spermidina* şi *bis-(3-aminopropil)-amina* (tabelul 5.1). Acizii nucleici pot forma complecşi nucleoproteidici şi cu alte proteine, cu masă moleculară mare şi fără un caracter bazic, de tipul albuminelor şi globulinelor (B e l o z e r s k i). Tipul de legătură dintre acizii nucleici şi componenta proteică nu este pe deplin cunoscut, propunîndu-se că acest complex este menţinut datorită legăturilor dintre ioni, dipoli şi de electrovalenţă.

Izolate pentru prima dată de F. M i e s c h e r, sub forma unei fracţii nucleoproteice denumită *nucleină*, *nucleoproteidele* s-au dovedit *componente de importanţă fundamentală pentru celule*, fiind *localizate în special în infrastructurile celulare care participă nemijlocit la diviziunea celulară şi la procesul de biosinteză a proteinelor.*

Cunoaşterea structurii nucleoproteidelor a devenit posibilă prin utilizarea unor metode de cercetare deosebit de fine şi exacte cum sînt spectrele de difracţie a razelor *X*, spectrofotometria în *UV* şi *IR*, diferite variante ale cromatografiei şi ale electroforezei, aplicate în concordanţă cu particularităţile fizico-chimice ale acestor macromolecule.

Structura şi proprietăţile componentei de natură proteică din nucleoproteide au fost expuse în capitolul 3. În cele ce urmează se va face o succintă analiză a structurii acizilor şi a componentelor din care ei sînt alcătuiţi.

TABELUL 5.1

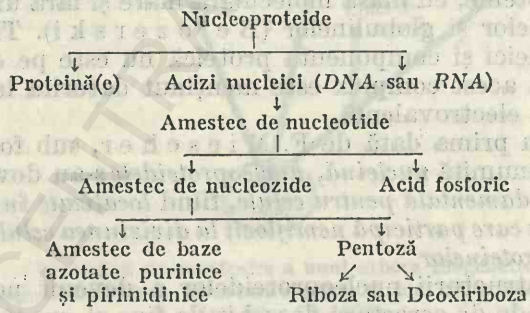
Natura proteinelor și a compușilor cu caracter bazic asociați în celulă cu macromoleculele de DNA și RNA

Denumirea proteinei sau a compusului cu proprietăți bazice	*Principalele proprietăți fizico-chimice sau structurale*	*Sursa biologică în care se întîlnesc*
1. Histone	Proteine bazice bogate în *Arg* și *Lys*; masă moleculară 10 000—20 000; acetilate sau fosforilate.	Plante și animale.
2. Histone bogate în *Lys*	Conțin pînă la 30% *Lys* și nu au *Cys;* puțină *Met.*	Plante și animale.
3. Histone bogate în *Arg*	Conțin pînă la 13—15% *Arg*; puțină *Met*; nu conțin *Cys*; masă moleculară 20 000.	Plante și animale.
4. Protamine	Masă moleculară 5 000; proteine bazice bogate în *Arg*; nu conțin *Cys, Tyr* și *Trp.*	Sperma de pește.
5. Spermină	$H_3\overset{\oplus}{N}-(CH_2)_2-\overset{\oplus}{N}H_2-(CH_2)_4-\overset{\oplus}{N}H_2-(CH_2)_3-\overset{\oplus}{N}H_3$	Bacterii.
6. Spermidină	$H_3\overset{\oplus}{N}-(CH_2)_3-\overset{\oplus}{N}H_2-(CH_2)_4-\overset{\oplus}{N}H_3$	Virusuri
7. Bis-(3-aminopropil)-amină.	$H_3\overset{\oplus}{N}-(CH_2)_3-\overset{\oplus}{N}H_2-(CH_2)_3-NH_3$	Virusurile plantelor.

5.1. ACIZII NUCLEICI

Acizii nucleici sînt substanțe macromoleculare, greu solubile în apă rece, mai ușor solubile în apă la cald și ușor solubile în soluții alcaline diluate; sînt insolubili în alcool etilic și în numeroși solvenți organici care, de regulă, adăugați peste soluțiile apoase ale acizilor nucleici determină denaturarea acestora.

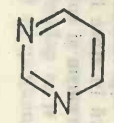
Degradarea hidrolitică succesivă a nucleoproteidelor în mediu acid sau alcalin, sau în prezența enzimelor specifice (nucleaze și enzimele înrudite lor v. cap. Enzime) decurge, în principiu, după schema:



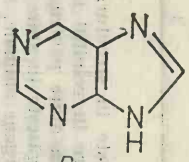
Schema aceasta este mult simplificată, deoarece în cursul hidrolizei menajate a acizilor nucleici rezultă, în ordinea formării lor, *polinucleotide*, *oligonucleotide* și numai ulterior *mononucleotide*. Pentru înțelegerea structurii acizilor nucleici și a proprietăților lor fizico-chimice vor fi descrise, în ordine inversă procesului de hidroliză, structura și proprietățile componentelor din care sînt alcătuiți. Structura ribozei și deoxiribozei, răspîndirea lor în lumea vie și unele proprietăți sînt redate în capitolul 9.

5.1.1 Baze azotate purinice și pirimidinice

Bazele azotate sînt compuși heterociclici a căror formulă structurală a fost stabilită prin analiză chimică, iar configurația prin metoda spectrelor de difracție a razelor *X* și derivă de la două cicluri de bază, pirimidina și purina prin substituirea hidrogenului la nivelul atomilor de carbon



Pirimidina

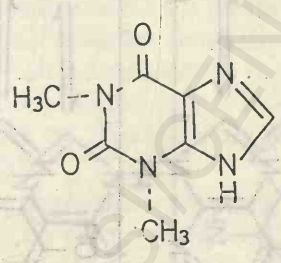


Purina

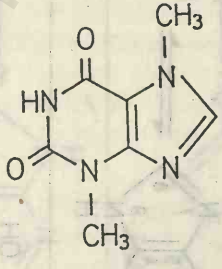
din cicluri cu grupări amino ($-NH_2$), metil ($-CH_3$) sau hidroxil ($-OH$). Introducerea grupării amino intensifică caracterul bazic al compusului, în timp ce introducerea grupării hidroxil accentuează caracterul său acid.

Acidul deoxiribonucleic conține bazele azotate de natură purinică, *adenina* și *guanina* și bazele azotate de natură pirimidinică, *citozina* și *timina*, în timp ce acidul ribonucleic conține *adenină* și *guanină*, ca baze purinice și *citozină* și *uracil*, ca baze pirimidinice. Structurile chimice ale acestor baze care pot exista sub două forme tautomere — *forma enolică sau lactim* și *forma cetonică sau lactam* — sînt redate în *tabelul* 5.2, împreună cu alte baze azotate care nu se întîlnesc în structura acizilor nucleici dar care sînt produși naturali de degradare ai acestora sau compuși intermediari în biosinteza lor.

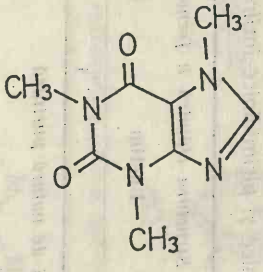
Unii derivați naturali ai purinelor se găsesc în stare liberă în cîteva plante tropicale și au o *puternică acțiune farmacologică*. Astfel, de exemplu, boabele de cacao (*Theobroma cacao*) conțin pînă la 2% *teobromină*, frunzele de ceai conțin *teofilină*, iar boabele de cafea — *cafeină*. Toate aceste substanțe sînt diuretice, în special primele două au o puternică acțiune diuretică, iar cafeina este un *excitant al sistemului nervos central* și stimulator al cordului. Formulele lor structurale sînt următoarele:



Teofilina



Teobromina

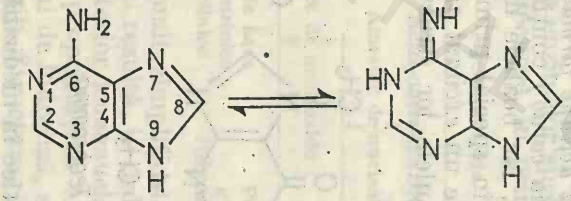
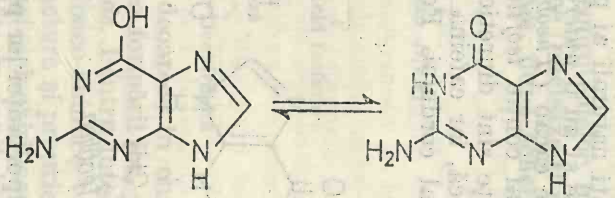
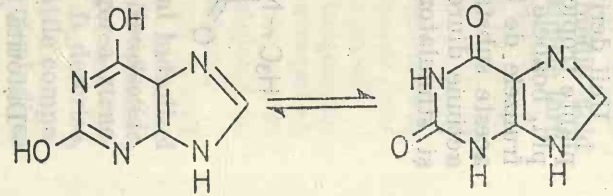


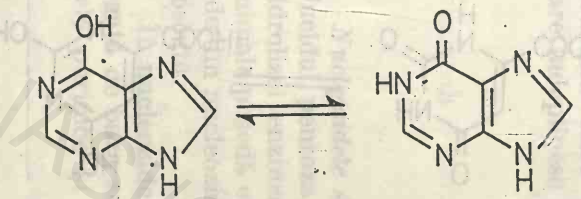
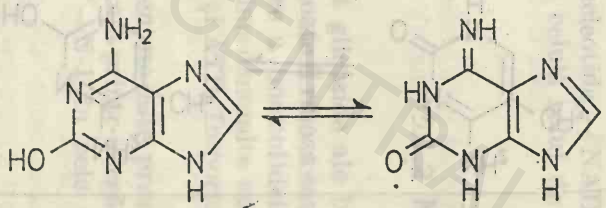
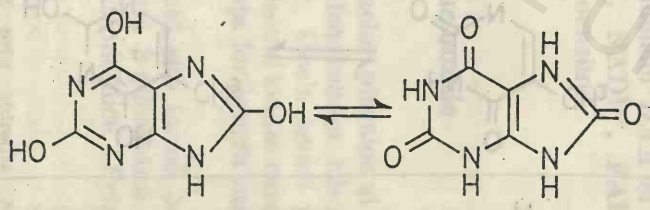
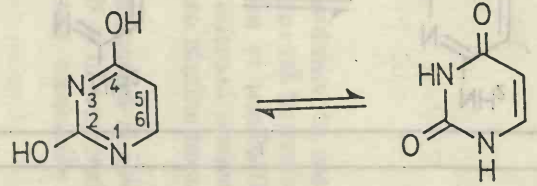
Cafeina

Datorită importanței lor practice în medicină derivații naturali cu acțiune farmacologică se obțin pe cale de sinteză.

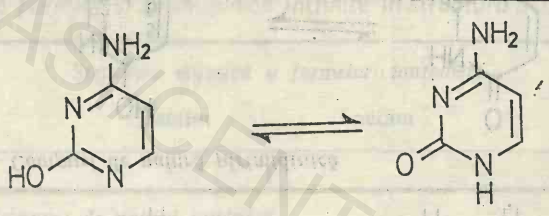
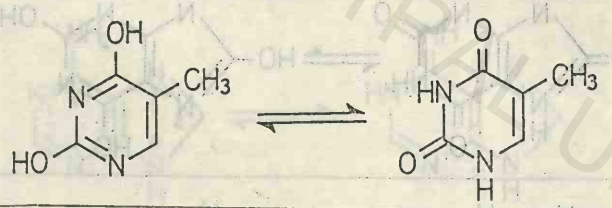
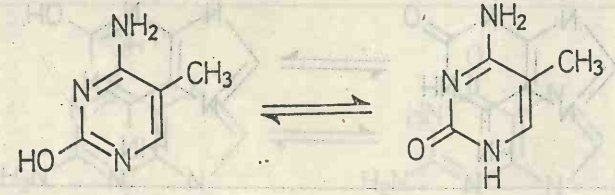
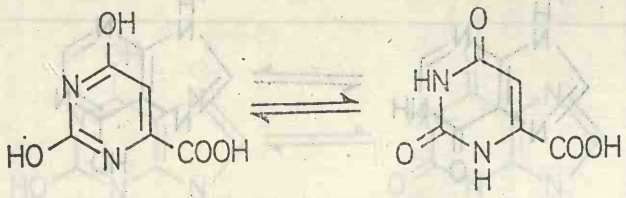
TABELUL 5.2

Bazele purinice și pirimidinice întîlnite în structura acizilor nucleici DNA și RNA sau ca produși intermediari ai metabolismului lor

Structura chimică a formelor tautomere Lactim — Lactam	*Denumirile uzuale și în nomenclatura* IUB — IUPAC	*Răspîndire și funcția biologică în organism*
1	2	3
I. — Compuși de natură purinică		
	Adenina (6-aminopurina)	Se întîlnește în structura *DNA* și *RNA*. La mamifere în condiții normale poate fi utilizată ca atare pentru sinteza nucleotidului ei. Se găsește în stare liberă în drojdii, diverse organe animale, în ceai și în sfecla de zahăr. Produs de degradare a *DNA* și *RNA*.
	Guanina (2-amino-6-hidroxipurina)	Rezultă prin degradarea *DNA* și *RNA*. Există în natură în stare liberă în cantități mici la pești, în carne și solzi.
	Xantina (2,6-dihidroxipurina)	Se formează din hipoxantină și prin dezaminarea *G*. Se găsește în stare liberă în singe, ficat, urină, la drojdii și la plante. Este precursorul metabolic al acidului uric.

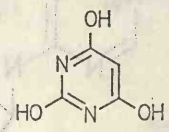
	Hipoxantina (6-hidroxipurina)	Rezultă în organism prin dezaminarea adeninei şi constituie precursorul xantinei în care trece prin oxidare. Se găseşte în stare liberă în muşchi, urină, sînge şi în cantităţi mai mari în sîngele leucemicilor împreună cu izoguanina (2-oxi-6-aminopurina)
	Izoguanina (6-amino-2-hidroxipurina)	Izomer al Guaninei. Se găseşte în stare liberă la leucemici şi se depune în articulaţii, ficat şi ţesutul muscular.
	Acidul uric	Se formează prin oxidarea xantinei şi este principalul produs de excreţie la reptile şi păsări rezultat în metabolismul azotului. La mamifere este degradat cu formare de alantoină. Se găseşte în stare liberă în sînge şi în urină.
II. — Compuşi de natură pirimidinică		
	Uracil (2,4-dihidroxipirimidina)	Uracilul, citozina, timina şi 5-metilcitozina rezultă prin degradarea în organism a nucleotidelor corespunzătoare şi prin hidroliza acizilor nucleici DNA şi RNA.

TABELUL 5.2 (continuare)

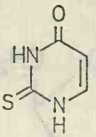
1	2	3
	Citozina (4-amino-2-hidroxi-pirimidina)	
	Timina (2,4-dihidroxi-5-metil-pirimidină)	
	5-Metilcitozină (5-metil-6-amino-2-hidroxi-pirimidină)	
	Acid orotic (acid 2,4-dihidroxi--pirimidin 6-carboxilic)	Se găsește în stare liberă în lapte. În organism acidul orotic este un precursor al acidului orotidilic.

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITARA LIBRARY

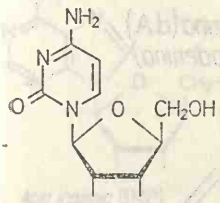
Dintre derivații pirimidinelor cei mai importanți sînt *acidul barbituric*, cu acțiune sedativă și hipnotică, *tiouracilul* cu proprietăți antitiroidiene, folosit ca medicament în hipertiroidism și tireotoxicoză și ca *antimetabolit* în cazul culturilor de *E. coli* și al VMT.



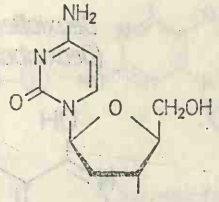
Acid barbituric (2,4,6 - trihidroxipirimidina)



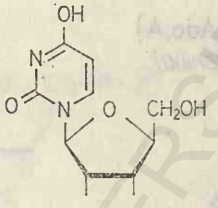
Tiouracil



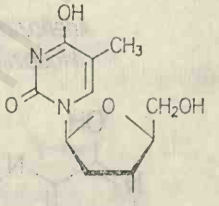
Citidina (Cyd,C) (Ribozilcitozina)



Deoxicitidina (dC) (Deoxiribozilcitozina)



Uridina (Urd,U) (Riboziluracil)



Deoxitimidina (dT) (Deoxiriboziltimină)

Dintre nucleozide adenozina pare să fie cea mai răspîndită, deoarece ea se găsește în structura acizilor nucleici *DNA* și *RNA* precum și în structura unor nucleotide — NAD^+, $NADP^+$, FAD și a coenzimei *A* care îndeplinesc în celulă rolul de coenzime.

5.1.2 Nucleozide

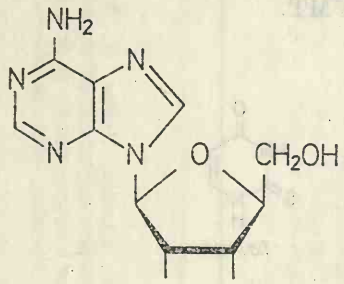
Nucleozidele sînt glicozide ale bazelor purinice și pirimidinice în care glucidul, pentoza, poate fi riboza sau deoxiriboza. Ele se formează în cursul hidrolizei enzimatice a nucleotidelor. Unele levuri precum și țesuturile animale posedă enzime denumite nucleozid kinaze care sintetizează nucleotide din nucleozide și ATP. Importanța lor pentru mamifere rămîne necunoscută.

În nucleozide pentoza este prezentă sub formă β-*D*-furanozică și este legată de baza azotată printr-o legătură β-glicozidică 1′→N-9 în nucleozidele purinice și 1′→N-1 în cele pirimidinice. *Principalele nucleozide* *

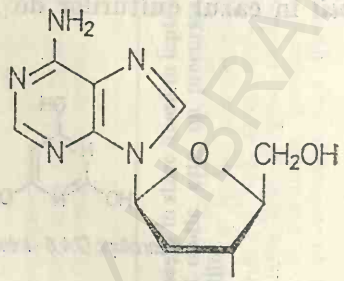
---

* *Nucleozidele metilate* care rezultă tot prin hidroliza acizilor nucleici nu sînt reprezentate.

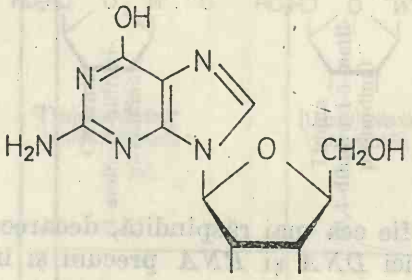
întîlnite în hidrolizatele acizilor nucleici și în structura lor sînt următoarele * :



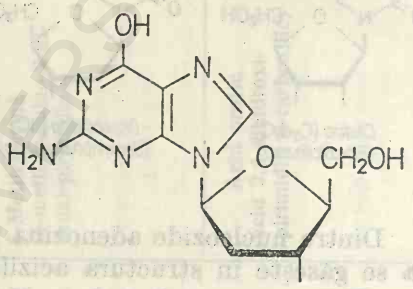
Adenozina (Ado,A)
(Riboziladenina)



Deoxiadenozina (dA)
(Deoxiriboziladenina)



Guanozina (Guo,G)
(Ribozilguanina)



Deoxiguanozina (dG)
(Deoxiribozilguanina)

Inozina și xantozina există și sub formă de deoxiinozină și deoxixantozină, cînd pentoza din structura lor este deoxiriboza.

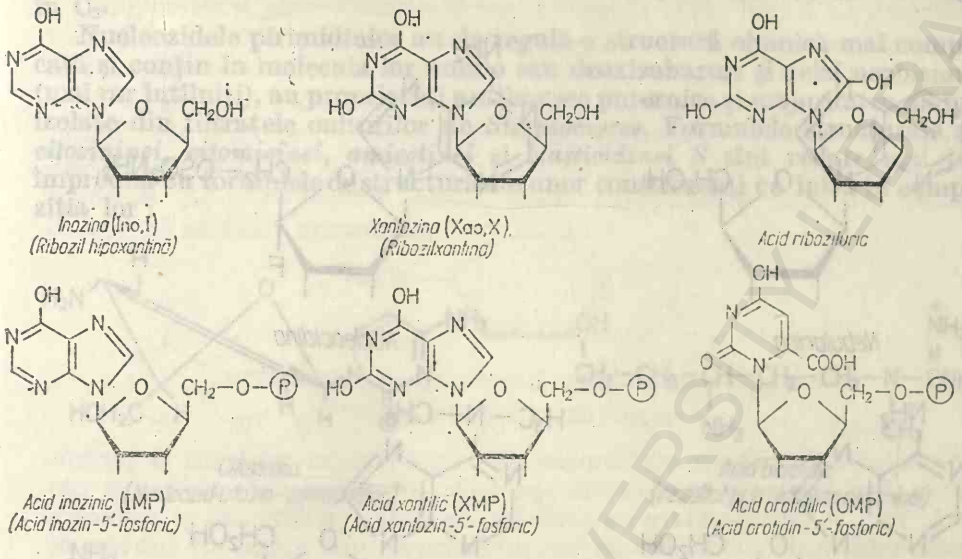
5.1.3 Alte nucleozide naturale

În țesuturile vegetale și animale, la microorganisme, se întîlnesc și alte nucleozide care nu intră în structura acizilor nucleici, dar constituie intermediari în biosinteza acestora sau în degradarea lor sau a nucleotidelor. Unele dintre acestea, de exemplu, *inozina* și *xantozina* se găsesc și

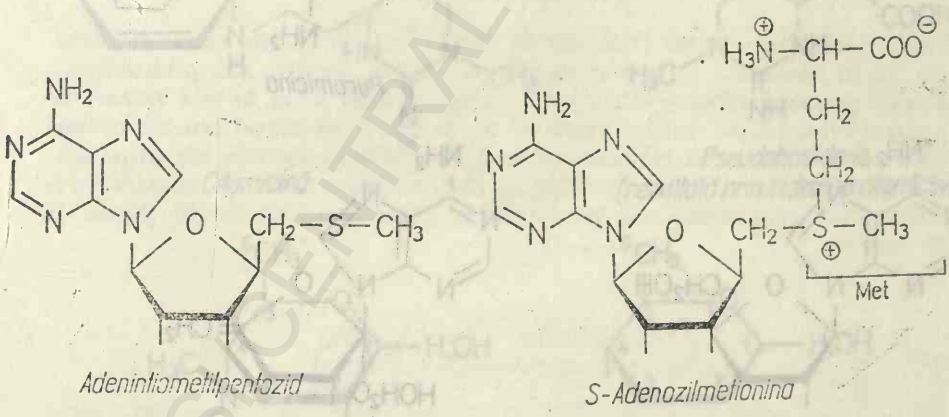
---

* În paranteze sînt redate prescurtările și simbolurile recunoscute de Comisia de nomenclatură biochimică de pe lîngă IUB-IUPAC și utilizate astăzi în literatura de specialitate. Scrierea formulelor este simplificată conform uzanțelor, pentru a sublinia deosebirile structurale.

în stare liberă în celule. Structura celor mai importanți intermediari întîlniți în biosinteza acizilor nucleici sau în căile catabolice ale nucleotidelor :

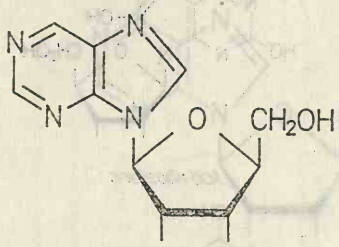


Prin hidroliza celulelor de drojdie de bere a fost pus în libertate un nucleozid denumit *adenintiometilpentozid*, iar în celule există un alt nucleozid *S-adenozilmetionina* care este un donor de grupări metil în procesele de transmetilare și cunoscut și sub denumirea improprie de *metionină activă* :

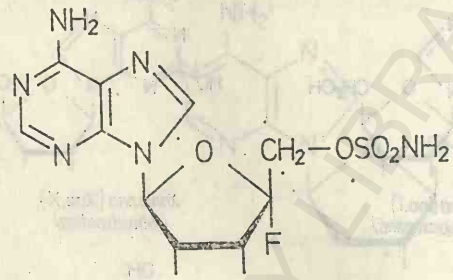


Se cunosc numeroase nucleozide de sinteză sau naturale care au o puternică acțiune bactericidă, și/sau antitumorală. Structura lor chimică este uneori foarte apropiată de structura nucleozidelor din compoziția acizilor nucleici. În continuare sînt date și unele substanțe nucleozid asemănătoare — *nebularina*, *nucleocidina*, *psicofuranina*, *puromicina*, *angustimicina* și

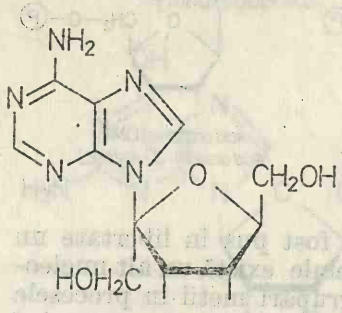
cordicepina — cu acțiuni citotoxice sau antifungale a căror structură chimică a fost stabilită prin degradarea chimică în mediu acid sau alcalin și uneori prin degradare enzimatică.



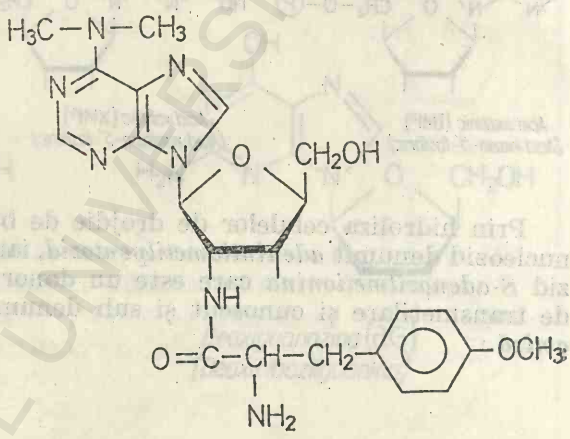
Nebularina



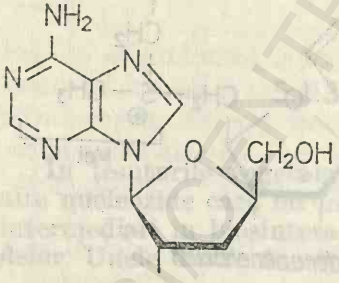
Nucleocidina



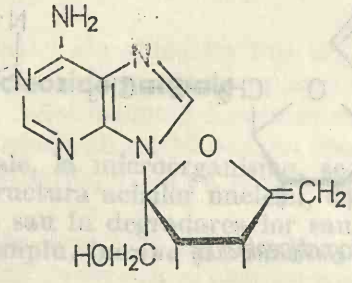
Psicofuranina



Puromicina



Cordicepina

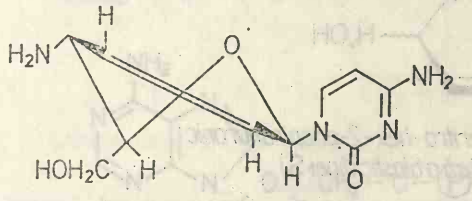


Angustimicina

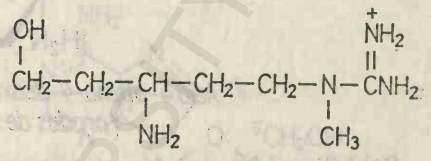
Unele nucleozide de natură purinică conțin în molecula lor fluoro--monozaharide și resturi de acid sulfamic, de exemplu, nucleocidina. Ele sînt produse de diferite tulpini de *Streptomyces* species (psicofuramina) sau

de fungi (puromicina). După cum se vede din formulele structurale aceste nucleozide conțin în moleculă diferiți derivați ai pentozei (riboza) care sînt oxidați la nivelul atomului de $C_{1'}$, sau substituiți în $C_{2'}$, $C_{4'}$, dehidroxilați în $C_{3'}$.

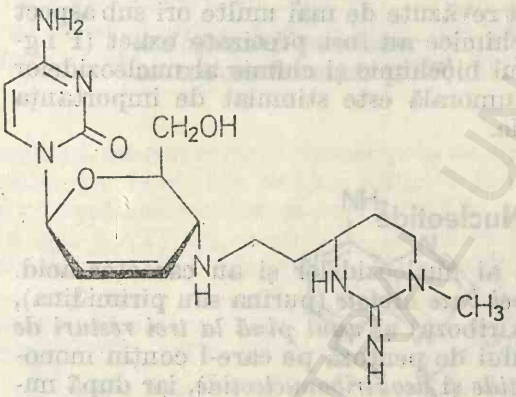
Nucleozidele pirimidinice au de regulă o structură chimică mai complicată și conțin în molecula lor amino sau deoxizaharuri și acizi neobișnuiți (mai rar întîlniți), au proprietăți antibiotice puternice și majoritatea au fost izolate din filtratele culturilor de *Streptomyces*. Formulele structurale ale *citozininei*, *citomicinei*, *amicetinei* și *blasticidinei S* sînt redate mai jos, împreună cu formulele de structură ale unor constituenți ce intră în compoziția lor :



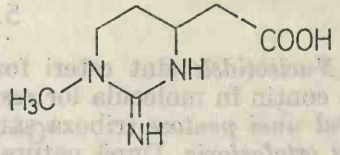
Citozinina
(Nucleozid citozin-asemănător)



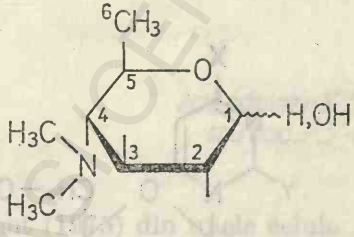
Acid blastidic
(rezultat prin hidroliza citozininei)



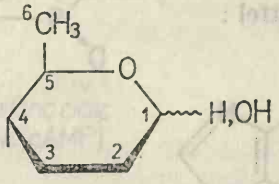
Citomicină



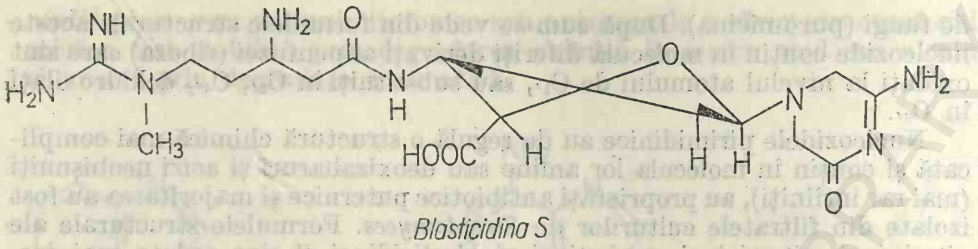
Pseudobastidona
(rezultată prin hidroliza citomicinei)



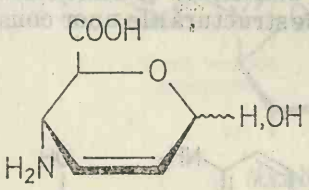
Amonozamina
(4,6-dideoxi-4-dimetilamino-D-glucoza, produs de hidroliză a amicetinei)



Amicetoza
(2,3,6-trideoxi-D-eritrohexoza, produs de hidroliză a amicetinei)



Blasticidina S

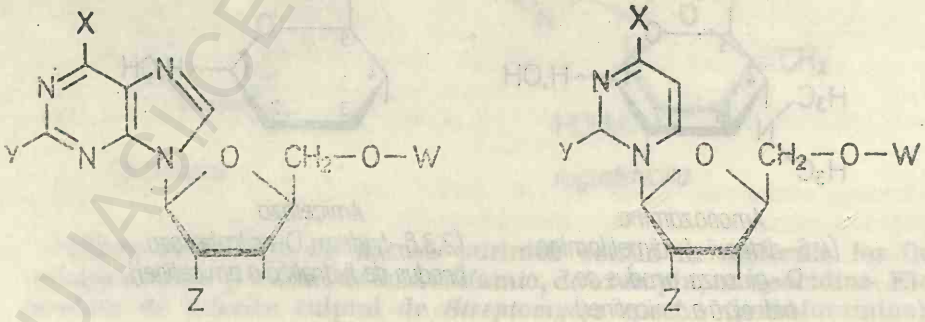


Acid 4-amino-4-deoxi-D-eritro-hex-2-enopiranuronic
(produs de hidroliză a blasticidinei S)

Stabilirea formulelor structurale ale nucleozidelor purinice și pirimidinice a fost realizată cu ajutorul spectrelor de rezonanță magnetică nucleară, în *UV*, prin oxidare cu periodat de sodiu, metanoliză și reducere cu borohidrură de sodiu. Ele au fost revăzute de mai multe ori sub aspect structural iar particularitățile lor chimice au fost precizate exact (P i g m a n și H o r t o n, 1970). Studiul biochimic și chimic al nucleozidelor cu activitate bactericidă sau antitumorală este stimulat de importanța lor în clinica umană și în zootehnie.

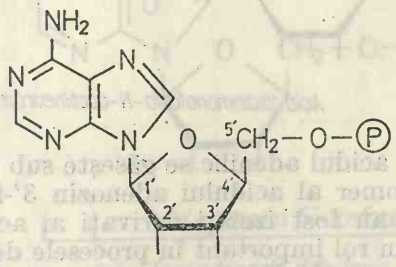
5.1.4 Nucleotide

Nucleotidele sînt esteri fosforici ai nucleozidelor și au caracter acid. Ele conțin în molecula lor *restul unei baze azotate* (purina sau pirimidina), *restul unei pentoze* (riboza sau deoxiriboza) și *unul pînă la trei resturi de acid ortofosforic*. După natura restului de pentoză pe care-l conțin mononucleotidele se împart în *ribonucleotide* și *deoxiribonucleotide*, iar după numărul resturilor de acid ortofosforic în nucleotide *mono-*, *di-* și *trifosforilate*. Formula structurală de principiu a unui mononucleotid poate fi redată astfel :

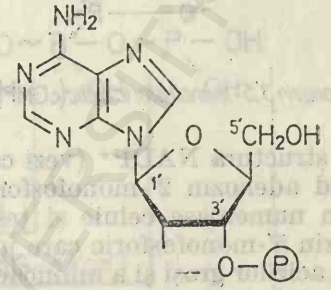


unde: X, Y poate fi $-NH_2$, $-OH$ sau $=O$; Z $-H$ sau OH, după caz, iar $W-1-3$ resturi de acid ortofosforic.

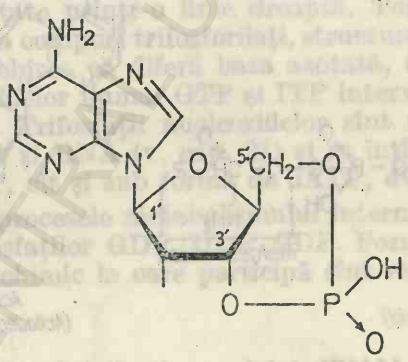
Nucleotidele monofosforilate se găsesc în stare liberă în drojdia de bere și în țesutul muscular și se deosebesc între ele prin poziția restului de acid ortofosforic. Acidul adenilic din mușchi este un *acid adenozin 5'-fosforic*, iar acidul adenilic din levuri un *acid adenozin 3'-fosforic*. Din celulele „țintă" ale organelor și țesuturilor asupra cărora acționează hormonii de natură polipeptidică și proteică S u t h e r l a n d, (1971) a izolat un acid *adenozin 3'5'-monofosforic* ciclic, care îndeplinește rolul de mesager secund al acțiunii hormonilor:



Acid adenozin 5'-monofosforic sau acid adenilic muscular (AMP)



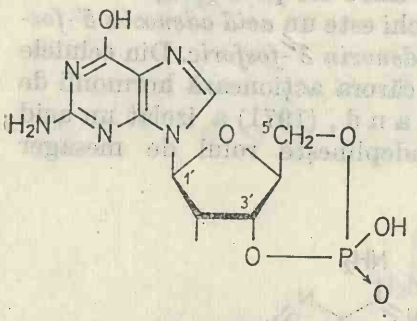
Acid adenozin 3'-monofosforic Acid adenilic din levuri (AMP)



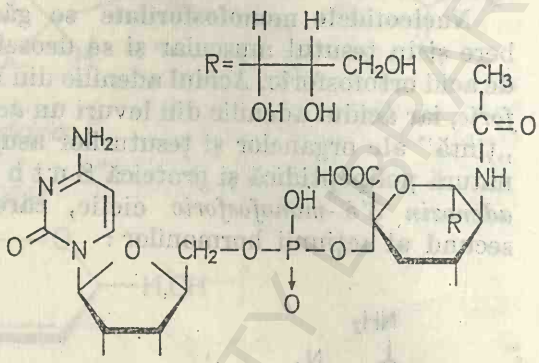
Acid adenozin 3',5'-monofosforic ciclic sau acid 3',5'-cicloadenilic (cAMP)

Recent (1975) din unele celule „țintă" ale hormonilor a fost izolat un nou nucleotid ciclic, acidul guanozin 3', 5'-monofosforic ciclic, care pare să îndeplinească același rol ca și cAMP. În 1959 C o m b și a l ț i i au izolat un compus care joacă rolul de intermediar în procesul de încorporare a acidului N-acetilneuraminic în oligozaharidele din lapte și în alte gluco-

proteine. Acest compus s-a dovedit a fi acidul citidin monofosfo-N-acetil-neuraminic.



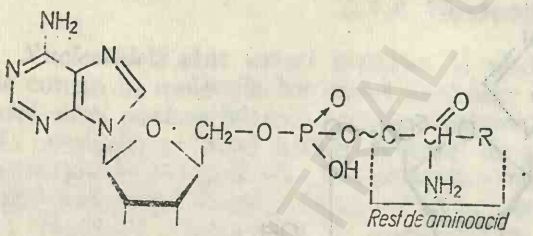
Acid guanozin 3',5'-monofosforic ciclic (cGMP)



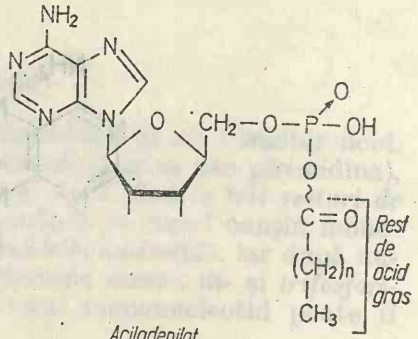
Acid citidinmonofosfo-N-acetilneuraminic

În structura $NADP^+$ (vezi cap. 8) acidul adenilic se găsește sub formă de acid adenozin 2'-monofosforic, izomer al acidului adenozin 3'-fosfat.

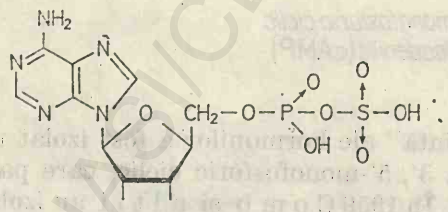
Din numeroase celule și țesuturi au fost izolați derivați ai acidului adenozin 5'-monofosforic care joacă un rol important în procesele de activare a acizilor grași și a aminoacizilor sau de esterificare a diferiților metaboliți celulari. Dintre aceștia formula structurală a fost elucidată pentru următorii:



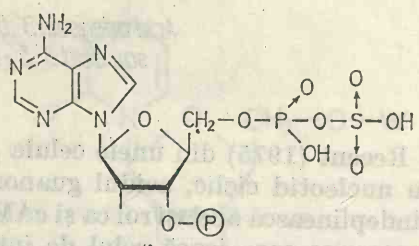
Amino aciladenilat
(Aminoacil-adenozinmonofosfat)



Aciladenilat
(Aciladenozinmonofosfat)



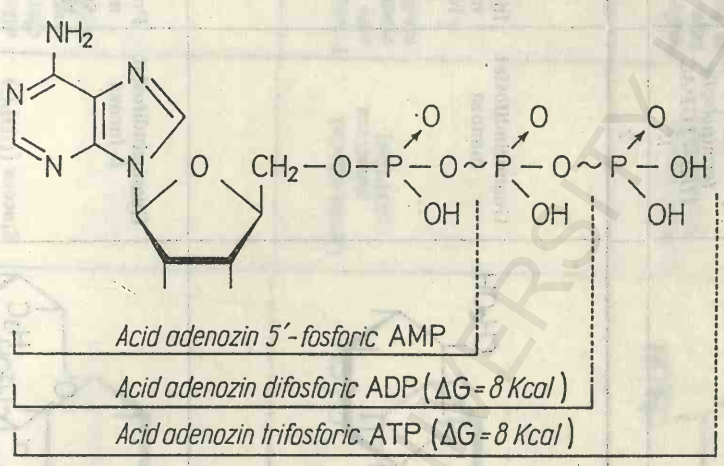
Acid adenozin 5'-fosfosulfuric



Acid 3'-fosfat-5'-fosfosulfuric

De remarcat faptul că din nou toţi aceşti derivaţi fosforilaţi ai bazelor azotate care îndeplinesc în organism rolul de intermediari în activarea acizilor graşi şi aminoacizilor şi în procesele de sinteză de esteri ai acidului sulfuric şi de cedare a grupării sulfat conţin baza azotată *adenina*.

Adenina stă, de asemenea, la baza familiei de compuşi cunoscută sub denumirea de *acizii adenilici*, substanţe macroergice universal răspîndite, care acumulează şi cedează, după caz, energia funcţionînd ca un fel de acumulator al celulelor vii. Resturile acidului ortofosforic în ADP şi ATP sînt unite între ele prin legături de tip special denumite de L i p m a n



legături macroergice şi notate prin semnul ~, spre deosebire de legăturile covalente obişnuite notate printr-o linie dreaptă. Toate bazele purinice şi pirimidinice pot forma compuşi trifosforilaţi, structura lor asemănîndu-se cu cea a ATP cu deosebirea că diferă baza azotată, dar dintre derivaţii trifosforilaţi ai nucleozidelor numai GTP şi ITP intervin în unele procese de energetică celulară. Trifosfaţii nucleozidelor sînt folosiţi în celulă şi pentru biosinteza DNA şi RNA (v. cap. 21) şi se întîlnesc sub formă de ATP, GTP, UTP, CTP, cît şi sub formă de *d*ATP, *d*GTP, *d*TTP, *d*CTP.

Un rol deosebit în procesele metabolismului intermediar îl îndeplinesc derivaţii nucleotid difosfaţilor GDP, UDP, CDP. Formula lor structurală precum şi procesul biochimic la care participă sînt redate în tabelul 5.3.

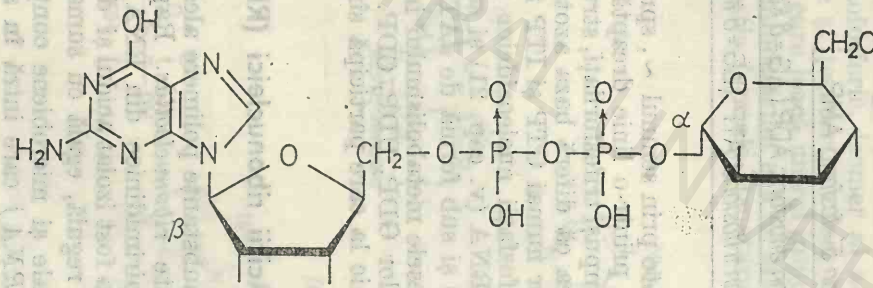
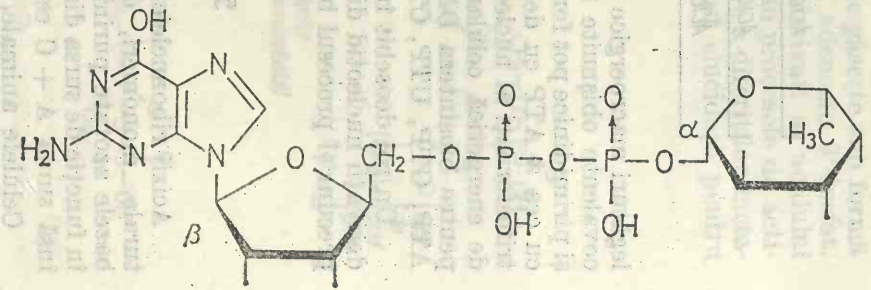
5.1.5 Acizii ribonucleici (RNA)

Acizii ribonucleici sînt substanţe polimere alcătuite din unităţi structurale, monomeri, denumite *ribonucleotide*. Raporturile molare dintre bazele azotate purinice şi pirimidinice din RNA variază în limite largi, în funcţie de sursa din care a fost izolat acidul şi de tipul de RNA studiat, însă suma A + C este, de regulă, egală cu suma G + U (tabelul 5.4).

Celulele animale, vegetale şi microbiene conţin RNA de mai multe tipuri: *RNA ribozomal (rRNA)* care intră în structura ribozomilor şi

TABELUL 5.3

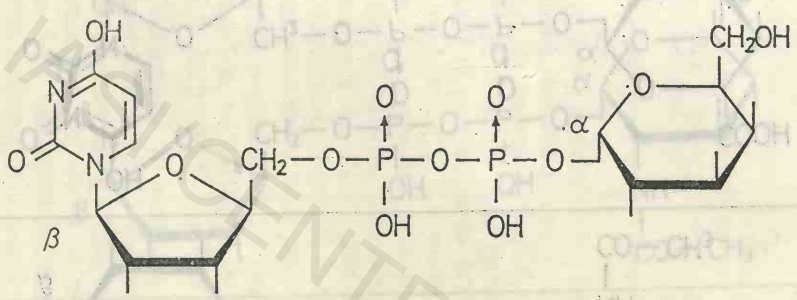
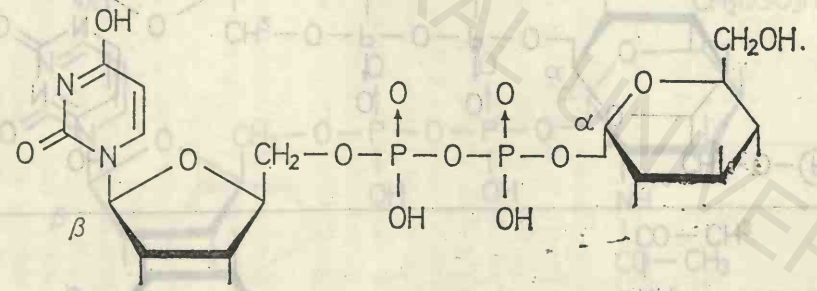
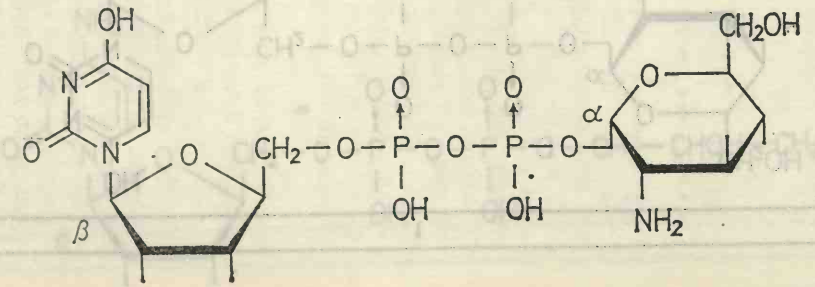
Derivații nucleotid difosfaților cu funcții coenzimatice în celule și formula lor structurală

Structura chimică a nucleotid difosfatului	*Denumirea obișnuită prescurtarea și terminologia IUB—IUPAC*	*Răspîndire și rolul îndeplinit în celulă*
1	2	3
I. — Nucleotide purinice. 	Guanozindifosfat manoza	Intermediar în metabolismul manozei. Se formează în celulă din GTP și manozo-1-P
	Guanozindifosfat *L*-fucoză	Precursorul natural al fucozei, monozaharid întîlnit în glicoproteidele și în oligozaharidele din lapte.

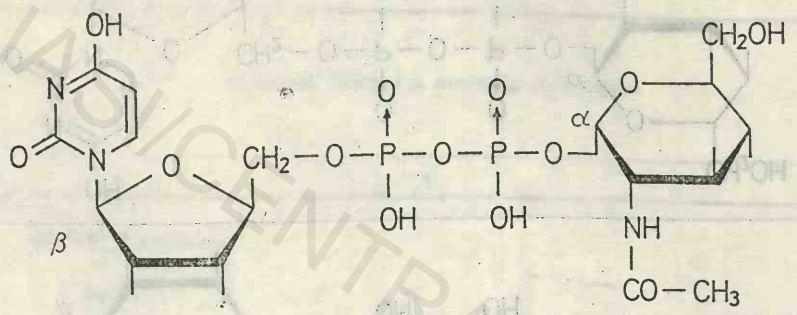
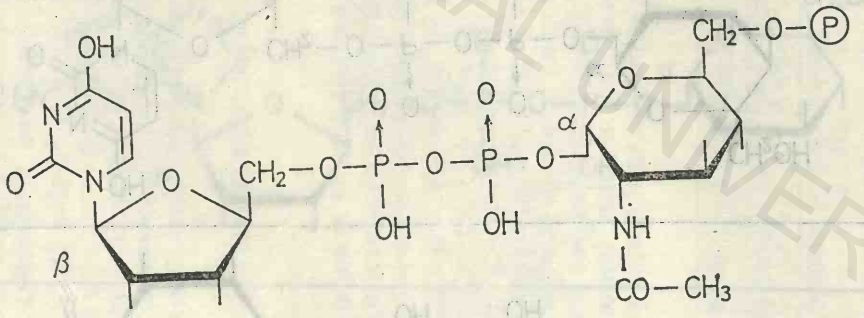
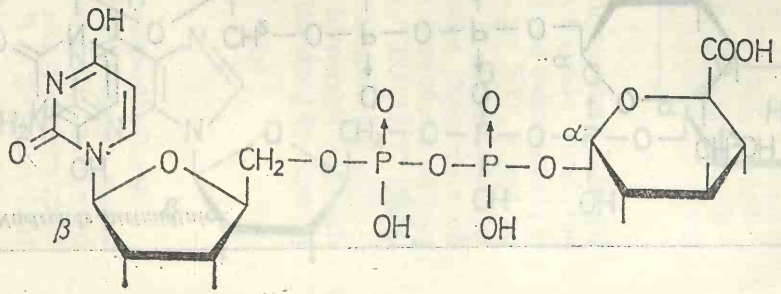
BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 5.3 (continuare)

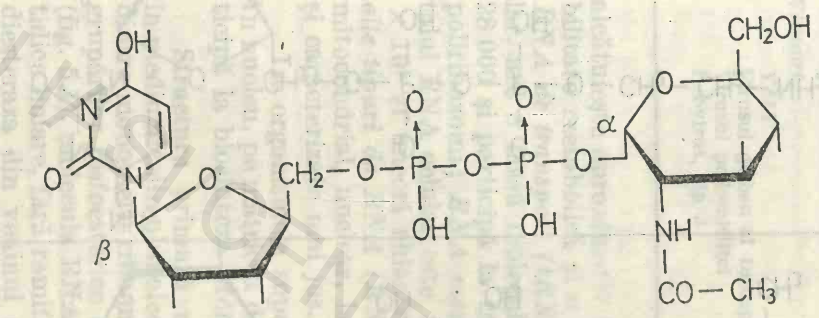
II. — Nucleotide pirimidinice.

	Uridindifosfat glucoza (UDPG)	Precursor al acidului uridindifosfoglucuronic și intermediar în procesele de transformare reversibilă a glucozei în galactoză.
	Uridindifosfat galactoza (UDPGal)	Produs intermediar în procesele de transformare a glucozei în galactoză și intermediar probabil în formarea lactozei
	Uridindifosfat glucozamina	Produs intermediar în biosinteza mucopolizaharidelor; se formează din UTP și glucozamino-1-P

TABELUL 5.3 (continuare)

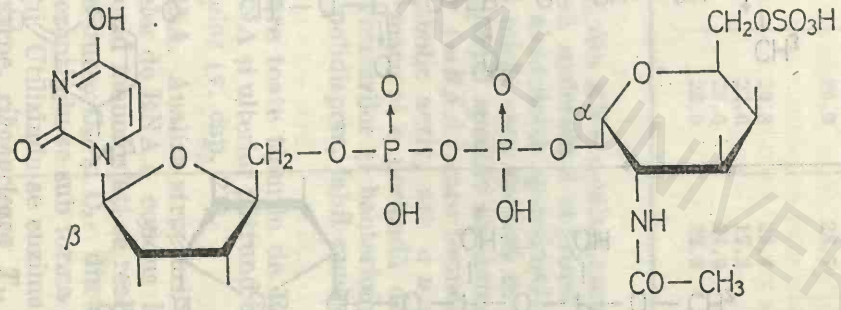
1	2	3
	Uridindifosfat N-acetilglucozamina	Produs intermediar în biosinteza mucopolizaharidelor și glicoproteidelor.
	Uridindifosfat N-acetilglucozaminofosfat	Produs intermediar în biosinteza mucopolizaharidelor și glicoproteidelor.
	Acid uridindifosfat glucuronic (acid UDP-glucuronic)	Constituie sursa de acid glucuronic în procesele de detoxifiere celulară; se întâlnește în structura unor polizaharide.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



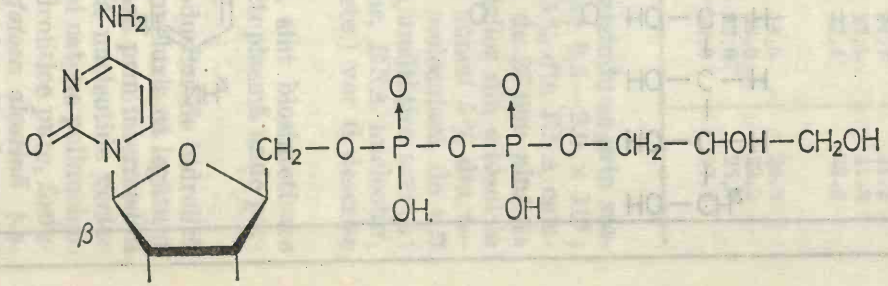
Uridindifosfat N-acetilgalactozamina

Produs intermediar al metabolismului întîlnit, probabil, în biosinteza mucopolizaharidelor.



Acid uridindifosfat N-acetilgalactozaminosulfuric

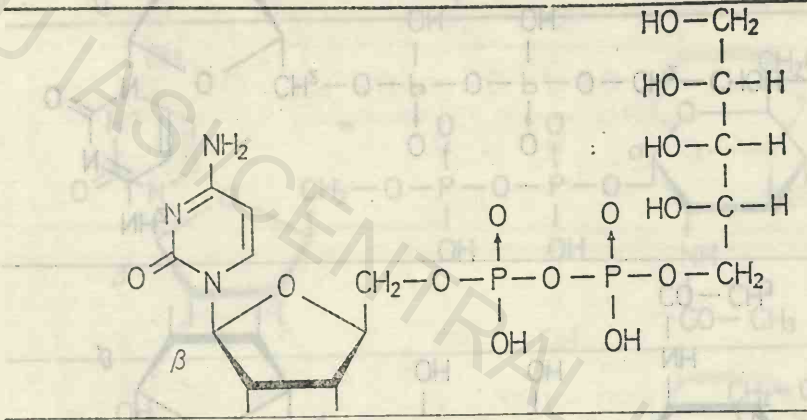
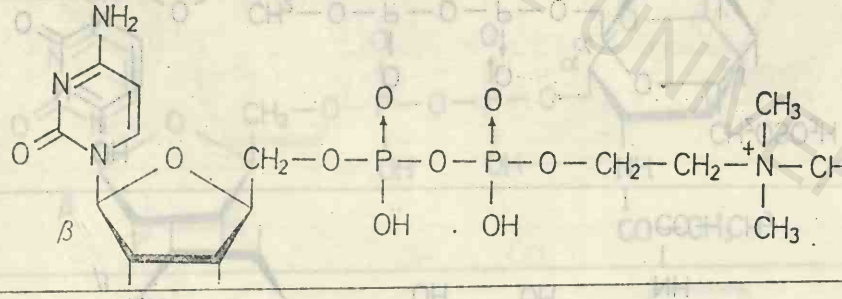
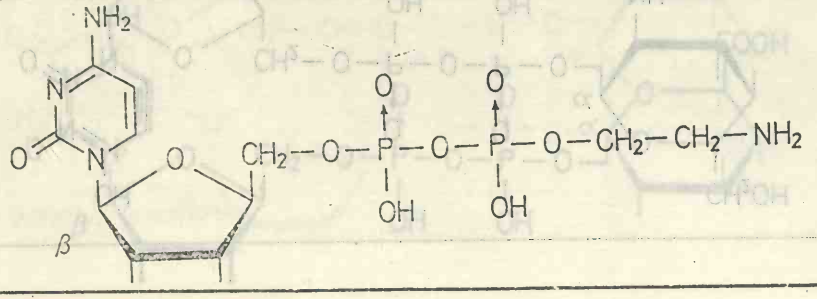
Produs intermediar în biosinteza celulară a mucopolizaharidelor



Citidindifosfat glicerol

Produs intermediar în biosinteza acidului teichoic, compus al peretelui celular al microorganismelor

TABELUL 5.3 (continuare)

1	2	3
	Citidindifosfat ribitol	Produs intermediar în biosinteza acidului teichoic, ca și citidindifosfat glicerolul.
	Citidindifosfat colina	Produs intermediar în biosinteza fosfatidilcolinei (lecitinei)
	Citidindifosfat etanolamina	Produs intermediar în biosinteza fosfatidiletanolaminei (cefalinei)

TABELUL 5.4

Compoziția procentuală în moli a bazelor azotate purinice și pirimidinice în molecula de RNA

Specia sau organul cercetat	*A*	*G*	*C*	*U*
Animale:				
Iepure	19,3	30,8	30,0	19,9
Ursin de mare	22,6	29,4	27,2	20,8
Ficat de bovine	17,1	27,3	33,9	21,7
Rinichi de șobolan	19,4	29,5	30,7	20,4
Plante:				
Grîu	25,2	30,8	25,4	18,6
Fasole	24,9	31,4	24,1	19,6
Papură	25,7	28,5	23,4	22,4
Levuri	24,3	27,3	22,5	25,7
Bacterii:				
Escherichia coli	25,3	28,8	24,7	21,2
Mycobacterium phlei	20,9	30,8	27,1	21,3
Staphilococcus sp.	26,9	28,7	22,4	22,0
Virusuri:				
VMT	29,8	25,4	18,5	26,3
Virusul galben al turneps	22,6	17,2	38,0	22,2
Virusul poliomielitei	28,6	24,0	22,0	25,4
Reovirus, tip 3	28,0	22,3	22,0	27,9

alcătuiește aproximativ 80% din RNA celular, caracterizîndu-se prin stabilitate metabolică și o masă moleculară cuprinsă între $0,5-2,0 \times 10^6$; *RNA de transport (tRNA)* alcătuiește aproximativ 15% din RNA celular, are o masă moleculară mică, care variază în jur de 25 000 pînă la 28 000 și participă la transportul specific al aminoacizilor din citosol la poliribozomi; *RNA mesager (mRNA)* care formează numai 5% din totalul RNA celular este metabolic activ, are o masă moleculară de $0,5 \times 10^6$ și uneori chiar mai mare și o perioadă de înjumătățire scurtă; *alte tipuri de RNA* (RNA virusurilor și bacteriofagilor, RNA nucleolar, mitocondrial, nuclear, labil polidispers, labil nuclear etc.) vor fi descrise și caracterizate mai jos.

La organismele superioare toate tipurile de RNA sînt biosintetizate în nucleu, pe matricea de DNA și ulterior pătrund în citoplasmă unde participă la biosinteza proteinelor (v. cap. 21).

Structura primară a RNA. Analiza structurii produșilor de hidroliză în mediu alcalin al moleculelor de RNA a condus la concluzia că legătura dintre monomerii ribonucleozid monofosfați se realizează prin intermediul grupărilor fosfoesterice care unesc $C_{3'}$ și $C_{5'}$ din două nucleotide vecine (fig. 5.1), molecula RNA prezentîndu-se sub forma unei catene polinucleotidice liniare, fără ramificații. Utilizîndu-se enzime hidrolitice pure, fosfodiesteraza din veninul de șarpe, *ribonucleaza* T_1, *fosfataza alcalină* ș.a. s-a constatat că lanțurile polinucleotidice ale RNA izolat din levuri și

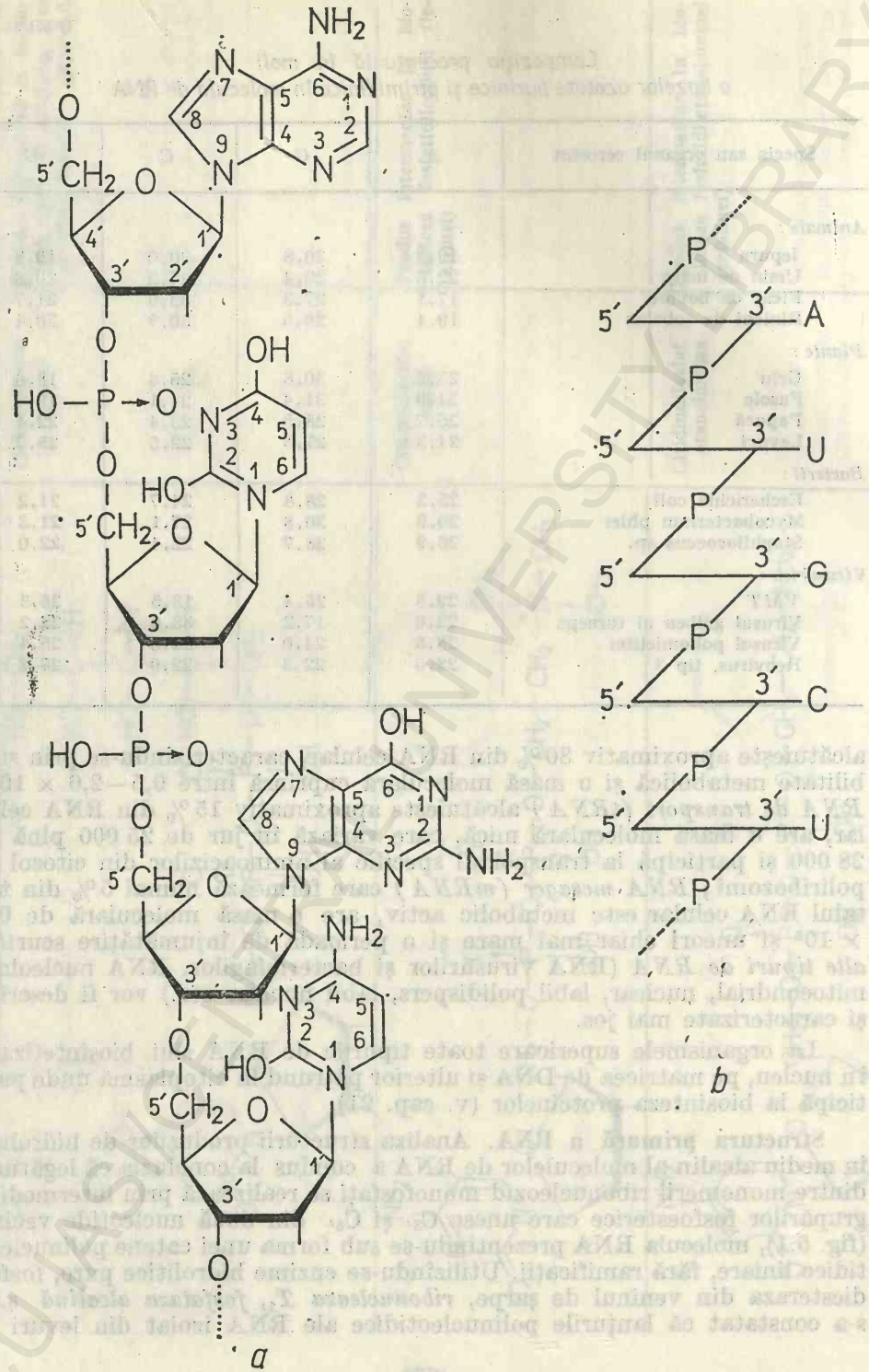


Figura 5.1.*a* — Structura primară a RNA ; *b* schema legăturilor $C_{3'} \rightarrow C_{5'}$ dintre mononucleotidele care alcătuiesc molecula.

BCU IASI UNIVERSITY LIBRARY

din virusul mozaicului galben se termină cu nucleotide ciclice — adenozin 2′, 3′-fosfat și guanozin 2′, 3′-fosfat (Markham, Smith, 1962).

Stabilirea succesiunii mononucleotidelor în moleculele de RNA, deci a structurii primare a RNA, a fost posibilă în ultimii zece ani grație metodelor analitice elaborate de Holley și alții (1965) pentru moleculele de tRNA, de Brownlee și alții (1967, 1968, 1974, 1977) pentru 5 S RNA, 16 S RNA și mRNA de diferite proveniențe.

Structura secundară a RNA. Structura secundară a moleculelor de RNA a fost mai puțin studiată decît structura secundară a DNA (descrisă mai departe în acest capitol) și în prezent este bine cunoscută numai pentru numeroase molecule de tRNA și pentru 5 S RNA izolat din *E. coli* (tulpina MRE 600).

În soluții cu tărie ionică mică moleculele de RNA se comportă ca lanțuri polielectrolitice tipice, iar prin creșterea tăriei ionice a soluției lanțurile (catenele) se scurtează, fenomen însoțit de micșorarea densității specifice și de modificarea constantei de sedimentare. Utilizarea preparatelor sintetice, obținute cu ajutorul *polinucleotidfosforilazei* (din ADP și UDP enzima sintetizează catene polinucleotidice de poli A și poli U) a demonstrat că între două catene polinucleotidice *poli*-A și *poli*-U se formează legături de hidrogen între A și U. Acești polimeri au fost analizați prin metoda difracției razelor *X* și s-a dovedit că acest complex reprezintă *o structură dublu spiralată*, unei spirale revenindu-i 10 baze azotate, iar pasul spiralei măsurînd 34 Å. Studiul acestor polimeri sintetici în *UV* a evidențiat *efectul hipocrom* *, iar încălzirea lor la 60°C, în mediul neutru și în soluții saline de NaCl 0,15 *M* a reprodus *efectul hipercrom* * (specific pentru structura secundară a DNA) însoțit de o micșorare sensibilă a absorbției la 589 nm. Aceste experiențe au fost reproduse și în cazul unor preparate de RNA ribozomal izolat din virusul mozaicului tutunului (VMT) ceea ce conduce la concluzia că pe *alocuri molecula* de RNA *se înfășoară pe anumite porțiuni* în așa fel încît între resturile adeninei și uracilului, pe de o parte, și resturile guaninei și citozinei, pe de altă parte, se formează legături de hidrogen, deci o structură secundară. Prin metoda difracției razelor *X* s-a demonstrat că moleculele de RNA reprezintă de fapt *o catenă polinucleotidică care prezintă segmente scurte spiralate, ce alternează cu regiuni nespiralate* (fig. 5.2). Se presupune că la formarea acestor segmente spiralate pot participa între 40—70% din resturile de mononucleotide ale moleculei (Spirin, 1963, 1965; Fresco și alții, 1963).

Acizii nucleici ai virusurilor plantelor sînt reprezentați exclusiv de acidul ribonucleic în timp ce virusurile animalelor și bacteriilor (bacteriofagii) conțin fie RNA, fie DNA.

RNA virusurilor plantelor și animalelor sînt mult mai ușor separați și au fost obținuți și în stare cristalină. RNA virusurilor vegetale constituie între 5 și 40% din nucleoproteidele din care acestea sînt alcătuite. RNA din virusul mozaicului tutunului este o macromoleculă, cu masa moleculară 2×10^6, formează aproximativ 5% din masa virusului și se prezintă sub forma unei singure molecule spiralate înfășurate în exterior într-o proteină (masă moleculară 38×10^6) alcătuită din 2 100 subunități

---

* V. Proprietăți fizice și chimice ale DNA.

proteice, dispuse sub formă de spirală). Fraenkel-Conrat și alții (1955; 1958) au reconstituit VMT—RNA și proteinele virusului, reușind să obțină un virus cu o activitate ce reprezintă 30—60% din activitatea

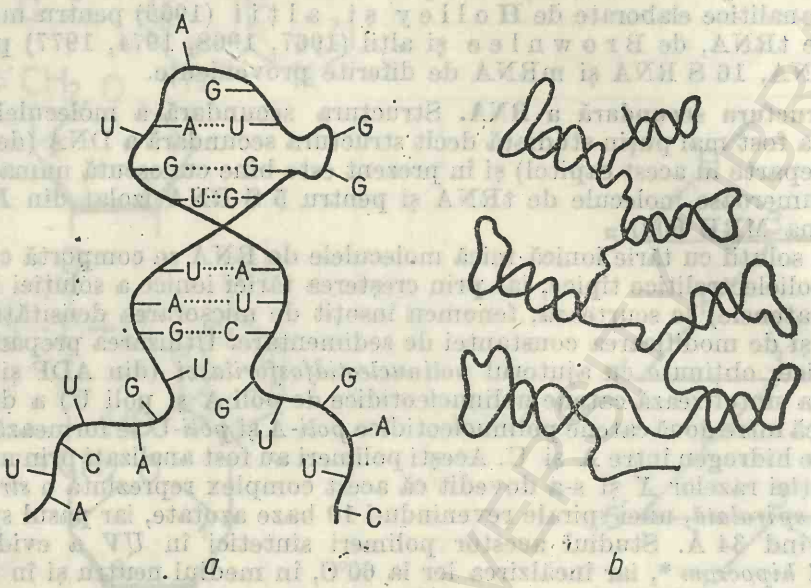


Fig. 5.2. — Structura secundară a RNA. Legăturile de hidrogen apar în regiunea care conține baze complementare în catena polinucleotidică formînd o spiră (după Spirin, 1963, 1965).

virusului natural. RNA din VMT este infecțios și capacitatea lui de a infesta tutunul este anulată după prelucrarea preparatelor cu ribonuclează.

Corpusculii poliedrici citoplasmatici de la *Prothetria dispar* și *Bombyx mori*, ca dealtfel și virusul poliomielitei conțin, de asemenea, RNA. Virusurile gripei, ciumei și mieloblastozei aviare care au o formă sferică și prezintă activitate enzimatică conțin 1 pînă la 3% RNA. Alte virusuri animale, de exemplu, virusurile encefalomielitei la cabaline, encefalitei Mengo, encefalomiocarditei șoarecilor și șopîrlei, poliomielitei ș.a. conțin RNA cu proprietăți infecțioase și sînt *determinanți* genetici.

Bacteriofagii, de asemenea, pot conține în structura lor numai RNA. De exemplu, fagii *MS2*, *r17*, *f2* care parazitează pe *E. coli* și fagul *7S*, care infectează *Pseudomonas aeruginosa* conțin RNA. Conținutul procentual al RNA bacteriofagilor poate ajunge pînă la 31% din masa particulelor.

5.1.5.1. Acidul ribonucleic mesager (mRNA)

Acidul ribonucleic mesager (mRNA) denumit astfel după rolul îndeplinit în celulă — este sintetizat în nucleu și transmite informația genetică de la macromolecula de DNA la nivelul ribozomilor unde are loc pro-

cesul de translaţie a informaţiei în structura proteinelor, deci este un mesager — alcătuieşte numai cîteva procente din totalitatea acizilor ribonucleici celulari.

Studiul structurii primare a mRNA este dificil, pe de o parte, datorită vitezei relativ mari cu care se sintetizează, iar pe de altă parte, perioadei de înjumătăţire, deosebit de scurtă — 2,5 minute la 25°C la microorganisme, 3—4 ore în celulele HeLa pînă la cel mult cîteva zile în reticulocitele anucleate. Viteza de biosinteză şi perioada de înjumătăţire a mRNA sînt puse în directă legătură cu durata ciclului de reproducere celulară şi cu diferenţierea tisulară (Sirlin, 1972, Penman şi alţii, 1962, Fan, Mueller şi Bremer, 1968 şi Fan şi colab. 1964). mRNA celular se caracterizează, de asemenea, printr-o mare diversitate a masei moleculare care variază în limite foarte largi — de la $1-2 \times 10^3$ pînă la $2-5 \times 10^6$. De exemplu, *m*RNA care participă la sinteza unei catene polipeptidice a hemoglobinei, proteină cu o masă moleculară de 16 500, are o masă moleculară de aproximativ 150 000 daltoni, în timp ce la biosinteza histonelor, alcătuite din 100—200 resturi de aminoacizi, participă mRNA care depăşeşte de aproximativ 8—9 ori masa moleculară a acestora (Chantrenne şi alţii, 1967, Mueller, 1969). mRNA funcţional poate fi monocistronic, ca la eucariote sau policistronic ca la virusuri şi bacterii (Sirlin, 1972).

Compoziţia în baze azotate a *m*RNA este complementară cu cea a DNA şi peste 55% din bazele azotate sînt reprezentate de *A* şi *U*. *m*RNA nu conţine baze rare sau baze azotate modificate posterior procesului de biosinteză.

Recent (1978) graţie metodelor puse la punct de Sanger şi colaboratorii a fost posibilă stabilirea structurii primare a moleculelor de mRNA care participă la biosinteza catenelor polipeptidice de β-globină din hemoglobina umană (v. şi capitolul 21).

Spirin descoperă în 1969 lucrînd cu *m*RNA produs în timpul ontogenezei la peşti o particulă proteică care conţine *m*RNA pe care o denumeşte „*informozom*". Această proteină informozomală are după Sirlin rolul de a stabiliza chimic şi a proteja *m*RNA contra degradării enzimatice. În sprijinul acestei ipoteze pledează şi observaţia lui McLaughlin şi alţii (1968) care au observat că *m*RNA în contact cu ribozomii devine mai rezistent faţă de acţiunea nucleazelor, precum şi faptul că *m*RNA bacterial este degradat imediat după încheierea procesului de translaţie. Aceste particule de proteină identificate atît în nucleu cît şi în citoplasmă şi asociate cu *m*RNA sînt eliberate de polizomii hepatocitului şi celulelor L şi diferite structural de proteinele ribozomale; proteinele informozomale nucleare şi citoplasmatice sînt identice şi sînt componente permanente ale informozomului.

Rolul informozomului în procesele celulare rămîne obscur, deşi sînt formulate numeroase ipoteze. Una din aceste ipoteze presupune că informozomul transportă fragmente de DNA de *7S* din nucleu în citoplasmă, unde DNA se asociază cu polizomii (Bell, 1969) sau cu microzomii (Bond şi alţii, 1969).

5.1.5.2. Acizii ribonucleici de transfer (tRNA)

Aceste specii macromoleculare de RNA au fost descoperite de A l l e n și S h w e e t (1960) și au fost denumite RNA de transfer deoarece ele transferă aminoacizii din citoplasmă la nivelul polizomului unde se realizează sinteza proteinelor.

Moleculele de *t*RNA sînt cele mai cunoscute deoarece au o masă moleculară relativ mică și sînt alcătuite din aproximativ 75—85 resturi de nucleotide. O particularitate a acestor molecule rezidă în aceea că ele *conțin o cantitate apreciabilă de baze neobișnuite sau rare*, care de cele mai multe ori sînt derivați de substituție, de regulă, metilați, ai bazelor azotate. Astfel, de exemplu, *t*RNA izolat din drojdia de bere conține 18 baze metilate, în concentrații mai mari fiind *pseudouridina*, *ribozil timina* (5'-metiluridina), *N-6-metiladenozina*, *2'-O-metilguanozina*, *N-2,N-2-dimetilguanozina* etc. În figura 5.3 sînt redate principalele baze azotate „rare" găsite în moleculele diferitelor specii moleculare de *t*RNA.

În moleculele de *t*RNA au fost identificate și baze azotate care conțin sulf, de exemplu, *tiouridina*. În unele preparate de *t*RNA de origine vegetală au fost descoperiți și derivați izopentenil ai purinei — *6-amino-3(3'--metil-2'-butenil)-purina* sau *triacantina*, care posedă proprietăți biologice asemănătoare cu ale *citochininei* — un tip de hormon care inițiază separarea celulelor fiice de celulele parentale în procesul de *diviziune mitotică*. Plecînd de la această constatare unii autori presupun că *bazele azotate rare* ar îndeplini un rol important în *conformația tridimensională* a *t*RNA sau ar conferi acestor molecule o rezistență mai mare față de acțiunea hidrolitică a nucleazelor celulare.

Numeroase cercetări au demonstrat că bazele minore (neobișnuite) întîlnite în structura moleculelor de *t*RNA sînt rezultatul unui proces de metilare care are loc după sinteza acestor molecule și se realizează în *nucleol*. Acest proces de metilare a nucleotidelor din *t*RNA necesită participarea unor enzime sintetizate în nucleu în concordanță cu informația codificată în succesiunea nucleotidelor în ADN nuclear. La diferite organisme procesul de metilare a bazelor azotate din *t*RNA este diferit și specie specific, deoarece unele molecule de *t*RNA de la o specie, care sînt deja metilate, pot fi metilate în continuare de enzimele din nucleolii celulelor provenite de la alte organisme.

Modificările care au loc după biosinteza speciilor moleculare de *t*RNA pot afecta toate bazele azotate — purinice și/sau pirimidinice — și anvergura lor poate atinge pînă la 1/4 din moleculă. Ele pot consta în metilare, pseudo — și dehidrouridilare, formare de citokinine, tiolare și altele, dar la mamifere procesul de metilare este specific pentru o bază azotată dată și este și specie specific. Procesul de tiolare al *t*RNA este important și sub aspectul că permite formarea de punți disulfurice intramoleculare. Procentul modificărilor postbiosintetice ale *t*RNA crește progresiv de la fagi, la micoplasmă, bacterii, drojdii și la animale și este pus în strînsă legătură cu evoluția viețuitoarelor.

Funcția bazelor neobișnuite prezente în moleculele de *t*ARN rămîne insuficient de bine studiată.

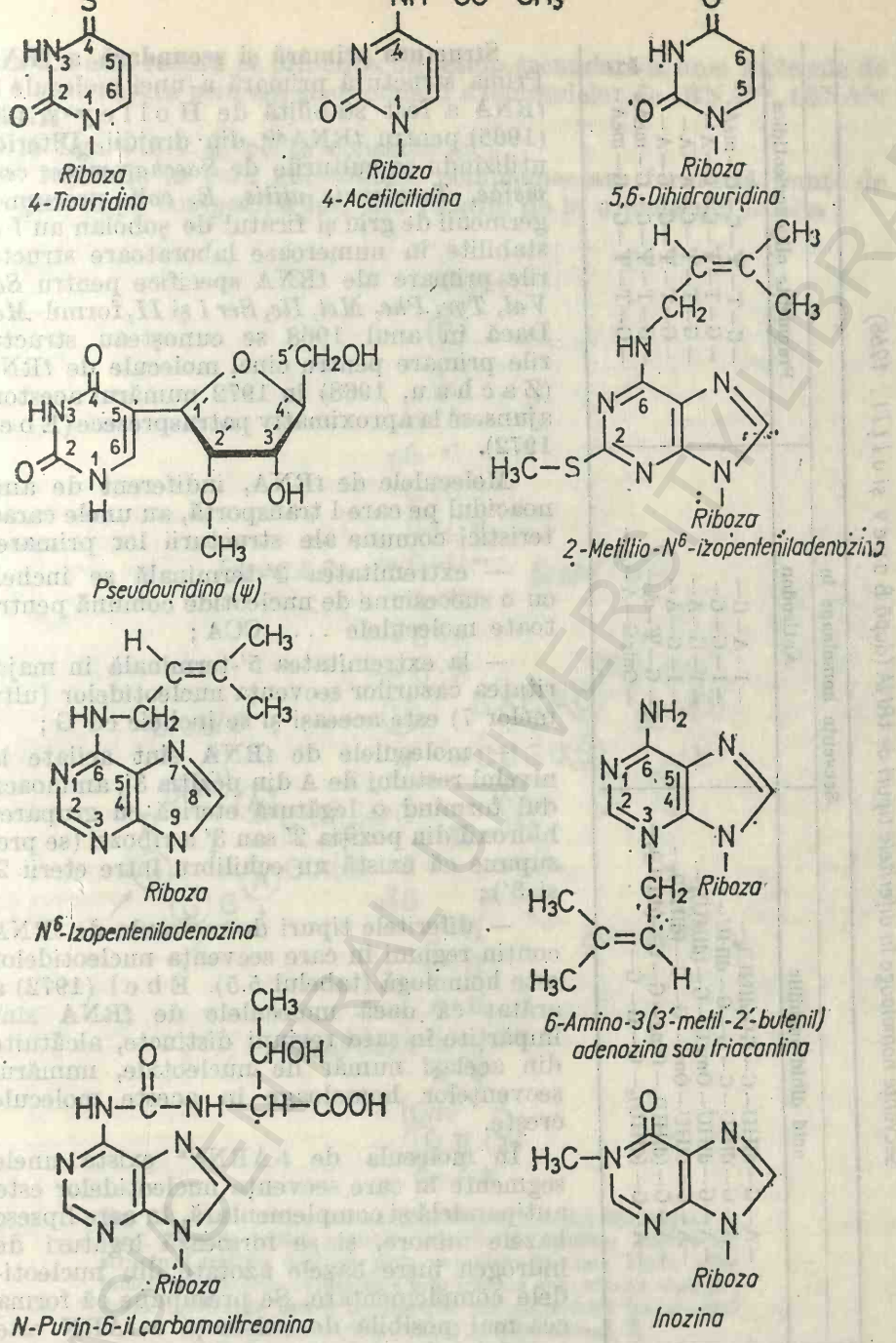


Fig. 5.3. — Baze azotate „rare" identificate în structura *t*RNA. Două nucleotide metilate au fost identificate în toate moleculele de *t*RNA : timidina sau 5-metiluridina, și pseudouridina (Ψ). Ultima este o nucleotidă metilată în care legătura N-glicozidică, specifică nucleotidelor ($N_1 \rightarrow C_{1'}$) a fost înlocuită printr-o legătură C—C ce se formează între C_5 și $C_{1'}$.

TABELUL 5.5

Secvențe homologe în diferitele tipuri de tRNA (după Bayev și alții, 1968)

Tipul de *t*RNA	Secvențe homologe în		
	acid dihidrouridilic	Anticodon	Fragmente oligonucleotidice
Val_1	—A—G—diHU—C—GG(diHU)$_2$—	—I—A—C—	—C—T—Ψ—C—G—mcA
Ala	—A—G—diHU—C—G—diHU—	—I—G—C—	—G—T—Ψ—C—G—A—
Ser_1	—A—G—diHU—OmeG—G—(diHU)$_2$—	—I—G—A—	—G—T—Ψ—C—A—A—
Ser_2	—A—G—diHU—Ome—G—G—(diHU)$_2$—	—I—G—A—	—G—T—Ψ—C—G—A—
Tyr	—A—G—(diHU)$_2$—Ome—G—G—(diHU)$_3$—	—G—Ψ—A—	—G—T—Ψ—C—G—mcA—
Phe	—A—G—(diHU)$_2$—G—G—G—	—OmeG—A—A—	—G—T—Ψ—C—G—mcA—

Structura primară și secundară a *t*RNA. Prima structură primară a unei molecule de *t*RNA a fost stabilită de Holley și alții (1965) pentru $tRNA^{Ala}$ din drojdii. Ulterior, utilizîndu-se culturile de *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulopsis utilis*, *E. coli*, precum și germenii de grîu și ficatul de șobolan au fost stabilite în numeroase laboratoare structurile primare ale *t*RNA specifice pentru *Ser*, *Val*, *Tyr*, *Phe*, *Met*, *Ile*, *Ser I* și *II*, formil-*Met*. Dacă în anul 1968 se cunoșteau structurile primare pentru cinci molecule de *t*RNA (Zachau, 1968) în 1972 numărul acestora ajunsese la aproximativ patruzprezece (Ebel, 1972).

Moleculele de *t*RNA, indiferent de aminoacidul pe care-l transportă, au unele caracteristici comune ale structurii lor primare:

— extremitatea 3′-terminală se încheie cu o succesiune de nucleotide comună pentru toate moleculele .... CCA;

— la extremitatea 5′-terminală în majoritatea cazurilor secvența nucleotidelor (ultimelor 7) este aceeași și se încheie cu G;

— moleculele de *t*RNA sînt acilate la nivelul restului de A din poziția 3′, aminoacidul formînd o legătură eterică cu gruparea hidroxil din poziția 2′ sau 3′ a ribozei (se presupune că există un echilibru între eterii 2′ și 3′);

— diferitele tipuri de molecule de *t*RNA conțin regiuni în care secvența nucleotidelor este homologă (tabelul 5.5). Ebel (1972) a arătat că dacă moleculele de *t*RNA sînt împărțite în șase regiuni distincte, alcătuite din același număr de nucleotide, numărul secvențelor homologe în aceste molecule crește.

În molecula de *t*-ARN^{Ala} există unele segmente în care secvența nucleotidelor este antiparalelă și complementară, în care lipsesc bazele minore, și se formează legături de hidrogen între bazele azotate din nucleotidele complementare. Se presupune că forma cea mai posibilă de existență a *t*ARN este „modelul frunzei de trifoi", propus pentru prima oară de Holley și alții (1965), model care permite, dealtfel, și o comparare a structurii diferitelor molecule de *t*ARN. În

figura 5.4 este redată în principiu structura secundară a unei molecule de *t*RNA și structura primară și secundară a moleculelor de $tRNA^{Ala}$, $tRNA^{Ser}$ și $tRNA^{Val}$.

Din figura 5.4 se poate constata că:

— regiunile în care nucleotidele complementare formează punți de hidrogen, după compoziția lor, sînt diferite de la o moleculă la alta;

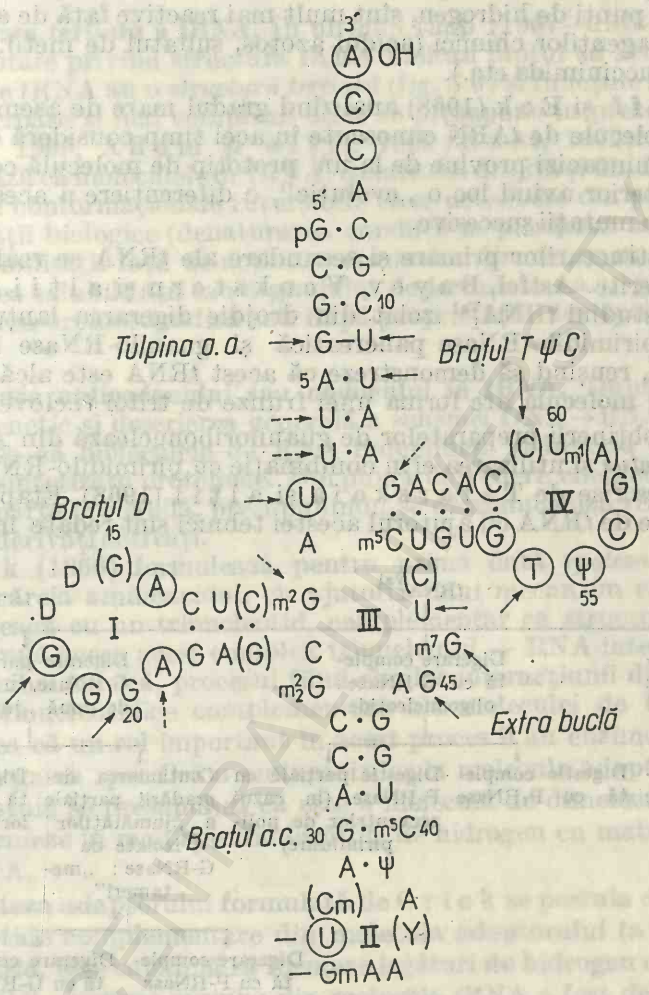


Fig. 5.4. — Structura secundară a $tRNA^{Phe}$ izolat din drojdia de bere. Săgețile indică punctele modificării stadiilor inițiale ale structurii terțiare nepliate prin tratament termic: liniile pline indică modificările evidențiate prin tehnica amprentelor digitale; liniile întrerupte indică modificările survenite după tratamentul cu ribonuclează pancreatică și ribonuclează T_1.

— regiunile fără punți de hidrogen conțin nucleotide asemănătoare, uneori identice, un număr mare de nucleotide metilate;

— împerecherea nucleotidelor complementare începe întotdeauna de la cea de a cincea nucleotidă de la extremitatea 3'-terminală și prima nu-

cleotidă din extremitatea 5'-terminală, ceea ce face posibil ca un trinucleotid terminal CCA să fie mereu liber. În molecula de formil-Met-*t*RNA prima bază de la extremitatea 5' formează o punte de hidrogen cu a șasea bază de la extremitatea 3', constituind singura excepție de acest fel cunoscută;

— în regiunile care nu posedă o structură secundară, bazele azotate nu formează punți de hidrogen, sînt mult mai reactive față de acțiunea enzimelor și a agenților chimici (acidul azotos, sulfatul de metil, acidul ftalic, N-bromsuccinimida etc.).

D a y h o f f și E c k (1968) analizînd gradul mare de asemănare între cele cinci molecule de *t*ARN cunoscute în acel timp consideră că *t*RNA al diferiților aminoacizi provine de la un prototip de moleculă comună proto-*t*ARN, ulterior avînd loc o „evoluție", o diferențiere a acestor macromolecule prin mutații succesive.

Studiul structurilor primare și secundare ale *t*RNA se realizează prin procedee diferite. Astfel, B a y e v, V e n k s t e r n și a l ț i i (1968) folosesc pentru studiul $tRNA_1^{Val}$ izolat din drojdie digerarea lanțului polinucleotidic cu pirimidilo-RNase pancreatică și guanilo-RNase izolată din actinomicete, reușind să demonstreze că acest *t*RNA este alcătuit din 77 nucleotide și molecula are forma unei frunze de trifoi („clover-leaf").

Tehnica obținerii preparatelor de guaniloribonuclează din *Actinomyces aureoverticillatus* și utilizarea ei în combinație cu pirimidilo-RNase pancreatică sînt descrise de T a t a r s k a i a și a l ț i i (1968). Etapele analizei unei molecule de *t*RNA cu ajutorul acestei tehnici sînt redate în figura 5.5.

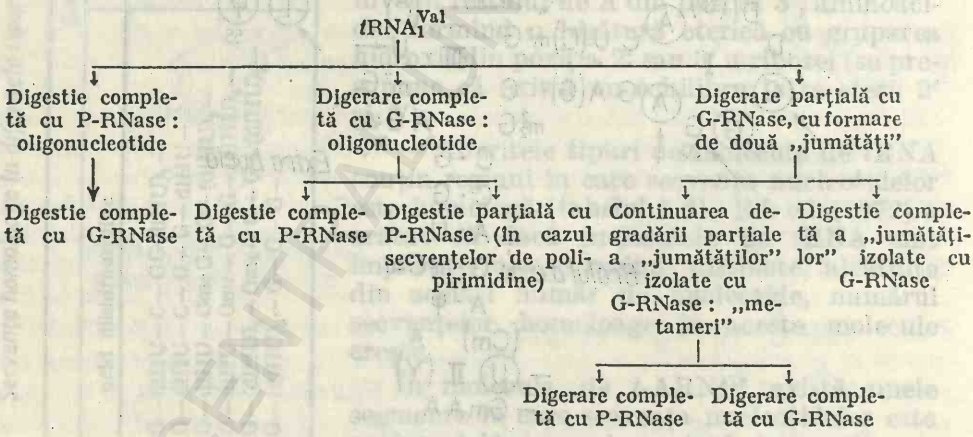


Fig. 5.5. — Etapele hidrolizei unei molecule de *t*RNA pe cale enzimatică în vederea stabilirii secvenței nucleotidice (după T a t a r s k a i a și a l ț i i, 1968).

Utilizînd cromatografia în strat subțire pe Sephadex G-75 autorii reușesc să obțină din cele două jumătăți ale moleculei — 3'-fragmentul ce conține 42 nucleotide și 5'-fragmentul format din 35 nucleotide — un complex cu proprietăți hidrodinamice foarte apropiate de ale moleculei native și cu o structură secundară similară acesteia. Aceeași autori determină că anticodonul $tRNA_1^{Val}$ este trinucleotidul IAC (v. pag. 209). În același an

Marcker, Dube și Clark (1968) elucidează secvența nucleotidică a N-formil-metionyl-*t*RNA izolat din *Escherichia coli*.

Bayev și alții (1967) au arătat că molecula de $tRNA_1^{Val}$ este hidrolizată, în condiții blînde, de guanilribonuclează la nivelul anticodonului, regiune accesibilă atacului enzimei, deoarece această regiune nu are o structură secundară.

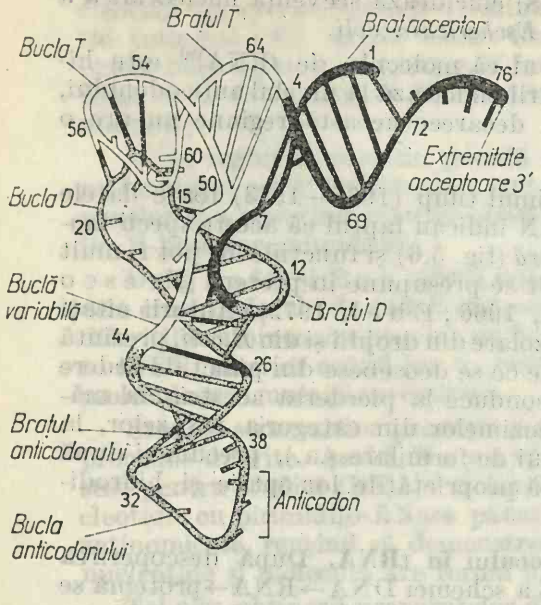
Structura terțiară a tRNA. În ultimul timp (1967—1973) toate datele experimentale privind structura *t*ARN indicau faptul că aceste specii moleculare de *t*RNA au o *structură terțiară* (fig. 5.6) și funcțiile lor pot fi mult mai numeroase și mai complexe decît se presupune în prezent (Fresco și alții, 1965, Adam și alții, 1966; Ebel, 1972). Autorii citați menționează că moleculele de *t*RNA, izolate din drojdii și din *E.coli*, prezintă două stări conformaționale reversibile ce se deosebesc din punct de vedere al activității biologice (denaturarea conduce la pierderea acesteia, la mărirea sensibilității față de acțiunea enzimelor din categoria RNazelor, la modificarea solubilității sau a gradului de formilare ș.a.), precum și după comportarea cromatografică sau după proprietățile lor optice și hidrodinamice.

Structura anticodonului sau nodocului în tRNA. După descoperirea codului genetic și descrierea generală a schemei DNA→RNA→proteină se presupunea că moleculele de RNA îndeplinesc și funcția de matrice pe care sînt sintetizate proteinele. Din punct de vedere energetic această ipoteză era foarte probabilă, presupunîndu-se că aminoacizii reacționează sub formă de derivați activați.

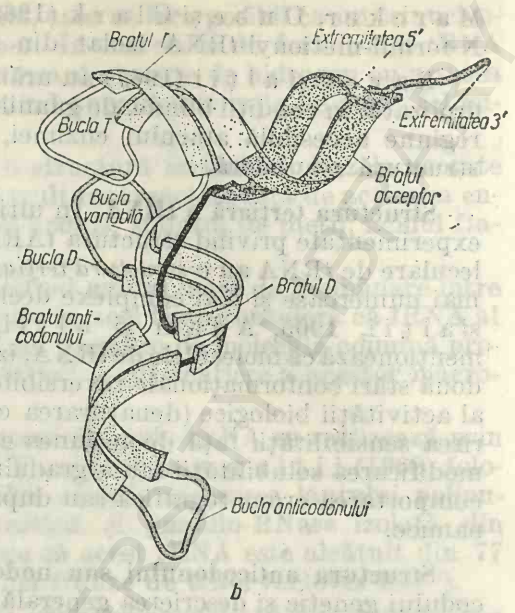
Crick (1966) formulează pentru prima dată *ipoteza adaptorului*, conform căreia aminoacidul, cu ajutorul unui mecanism enzimatic oarecare, se leagă cu un trinucleotid, complementar ca structură cu codonul RNA și după aceea acest complex trinucleotid — RNA interacționează cu matricea ribonucleică, procesul fiind similar interacțiunii dintre cele două catene polinucleotidice complementare ale moleculei de DNA. Crick presupunea că un rol important în acest proces îl au enzimele care participă la legarea specifică a aminoacizilor la molecula adaptorului. În privința acestuia se presupunea că este o moleculă de dimensiuni mici capabilă să formeze în mod specific legături de hidrogen cu matricea nucleotidică a RNA.

În ipoteza adaptorului formulată de Crick se postula că o succesiune de nucleotide complementare din molecula adaptorului (a *t*RNA) probabil, *o tripletă*, este capabilă să formeze legături de hidrogen cu unul din codonii *m*ARN. Această regiune din molecula *t*RNA a fost denumită *anticodon* sau *nodoc*.

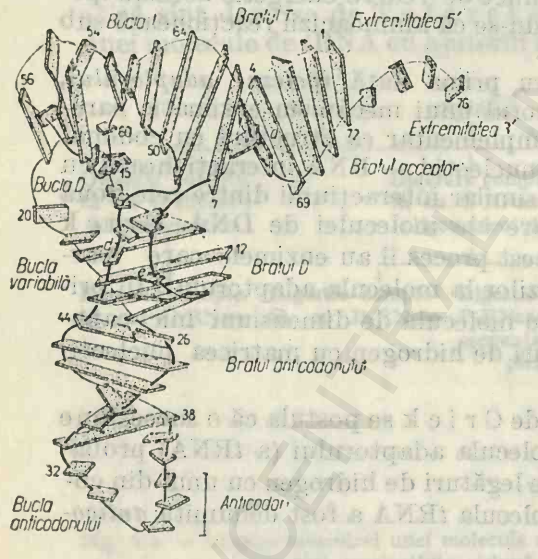
Demonstrarea existenței reale a anticodonului în regiunea centrală a foii de trifoi, a fost posibilă deoarece s-a putut stabili, datorită prezenței nucleotidelor „minore", structura primară a moleculelor de *t*RNA. Primele cercetări au fost efectuate pe moleculele de *t*RNA, izolate din drojdia de bere, care participă la transportul alaninei, serinei, tirozinei, fenilalaninei și valinei reușindu-se determinarea secvenței nucleotidelor și compararea diferitelor molecule de *t*ARN.



a



b



c

Fig. 5.6.-a — Structura terțiară a $tRNA^{Phe}$ din drojdia de bere. „Osatura" ribozo—fosfat este reprezentată printr-o linie groasă neîntreruptă, iar legăturile de hidrogen dintre bazele perechi sînt simbolizate prin linii subțiri neîntrerupte; bazele azotate neperechi sînt redate prin linii subțiri scurte.

b — reprezentarea schematică a segmentelor helicoidale din molecula de $tRNA^{Phe}$ care corespund la patru brațe ale diagramei în formă de frunză de trifoi: brațele anticodonului, D,T, și brațul acceptor. Fiecare regiune helicoidală corespunde la zece baze perechi și unui tur de elice analog dublului helix al DNA, dar format din două regiuni diferite ale aceleiași catene polinucleotidice.

c — reprezentarea schematică a orientării bazelor azotate în molecula de $tRNA^{Phe}$. Scheletul moleculei polinucleotidice este reprezentat printr-o linie subțire neîntreruptă. Bazele neperechi sînt redate prin plăcuțe dreptunghiulare mici, iar bazele perechi prin plăci dreptunghiulare mari care unesc cele două catene polinucleotidice. Interacțiunile care apar între baze prin plierea lor în interiorul moleculei (*a*—*f*) constituie factorul principal al asigurării unei mari stabilități (după Rich și Kim, 1978).

Din punct de vedere teoretic *anticodonul* trebuie să conțină o secvență nucleotidică complementară codonului. În molecula diferitelor tipuri de *t*RNA (fig. 5.4) există o secvență de trei nucleotide care satisface aceste cerințe, dacă *inozina* și *metilguanina* sînt considerate echivalente guaninei, iar *pseudouridina* echivalentă uridinei.

În cazul diferitelor molecule de *t*RNA se poate stabili următoarea *complementaritate între codon și anticodon** :

*Molecula de t*ARN	*Codonul*	*Anticodonul*
$tARN^{Ala}$	GCC	CGI
$tARN^{Tyr}$	UAC	AΨG
$tARN^{Ser}$	UCC	AGI
$tARN^{Phe}$	UUC	AAG
$tARN^{Val}$	GUC	CAI

Pleeînd de la observația că trei din cei 20 de aminoacizi au cîte doi codoni — serina : UCZ și AGY ; arginina : CGZ și AGX iar leucina UUX și CUZ — care nu se deosebesc între ei decît prin natura nucleotidului din poziția unu sau poziția doi (referindu-ne la codonii unui singur aminoacid), S ö l l și alții, verificînd experimental ipoteza lui C r i c k au reușit să izoleze cîte două și trei tipuri de *t*ARN pentru fiecare aminoacid, fiecare tip de *t*ARN „reacționînd" numai cu unul din cei doi codoni :

*t*ARN	Codonul „necunoscut"	Sursa de izolare a *t*RNA
$tRNA^{Arg\ I}$	CG (U ; C ; A)	Drojdia de bere
$tRNA^{Arg\ II}$	AG (A ; G)	Idem
$tRNA^{Leu\ I}$	CUG	*Escherichia coli*
$tRNA^{Leu\ III}$	UUG	Idem
$tRNA^{Ser\ I}$	U,C (U ;C)	Idem
$tRNA^{Ser\ II}$	U,C (A ; G)	Idem
$tRNA^{Ser\ III}$	A,G (U,C)	Idem

Din această enumerare rezultă că *t*RNA „recunoaște" în poziția trei numai anumite nucleotide, fie *U* și *C*, fie *A* și *G* fie *U*, *C* și *A* sau numai o singură nucleotidă *G*. Aceste fapte experimentale confirmă pe deplin regula cuplării bazelor codonului și anticodonului în poziția trei.

Ipoteza formulată de C r i c k și parțial confirmată experimental este într-un oarecare grad lacunară, deoarece cu excepția inozinei nu sînt luate în considerare și alte baze minore identificate în structura anticodonilor din diferite molecule de *t*RNA. Dacă pentru un singur aminoacid sînt două sau trei tipuri de *t*RNA există oare și aminoacil sintetaze specifice pentru fiecare *t*RNA sau toate moleculele de *t*RNA ale aceluiași aminoacid sînt acilate de aceeași aminoacil sintetază ?

Cercetările ulterioare au arătat că în citoplasmă și în mitocondrii există „seturi" deosebite de enzime care participă la acilarea *t*ARN în mod specific.

Stabilirea exactă a numărului de specii moleculare de *t*RNA prezente într-o celulă este, după opinia lui N o v e l l i (1967), imposibilă. Totuși, pentru celulele mamiferelor Y a n g și N o v e l l i (1971) au menționat prezența a minimum 80 de specii moleculare de *t*RNA, ceea ce corespunde la aproximativ 60 de codoni (numărul total al acestora este de 64).

Speciile moleculare de *t*RNA se formează în celulă din precursori, care au o moleculă mult mai mare, sînt inactivi (A l t m a n, 1971, S i r l i n și L o e n i n g, 1968) și în procesul transformării lor suferă, probabil, modificări conformaționale (B u r d o n și C l a s o n, 1969).

* Secvența bazelor în anticodon se scrie numai în sensul 3′—5′

RNA ribozomal (rRNA) alcătuiește 90% din totalul RNA celular și a fost izolat din ribozomii de diferite proveniențe (animali, vegetali, celule normale, hepatom N o w i k o f f etc.) și este localizat în cea mai mare parte în citoplasmă, unde este asociat cu proteinele ribozomale.

Relativ stabil în bacteriile în creștere și în celulele în curs de dezvoltare *r*RNA este de tip GC și are o perioadă de înjumătățire de 2—5 zile, iar diferitele specii moleculare ale lui sînt deosebite după constanta de sedimentare :

5*S* RNA; 16*S* RNA; 26*S* RNA; 28*S* RNA; 38*S* RNA și 45*S* RNA.

Acizii ribonucleici reprezintă, probabil, scheletul structural al ribozomilor pe care se atașează, în locuri specifice, proteinele ribozomale. S p i r i n și G a v r i l o v a (1969) au arătat că acizii ribonucleici ribozomali prezintă o structură secundară parțial organizată sub forma unui *dublu helix*. Regiunile dublu helicate ale moleculei *r*RNA sînt legate prin intermediul unor fragmente flexibile monocatenare. Structura lor secundară care cuprinde 70% din moleculă este dată de punțile de hidrogen formate în principal, dacă nu aproape exclusiv, între A—U și G—C. Prezența regiunilor de helix și masa moleculară mare a *r*RNA îi conferă acestuia și o structură terțiară bine conturată.

Spre deosebire de celelalte specii moleculare de RNA descrise pînă acum, moleculele de *r*RNA cu constante de sedimentare mai mari de 18 S sînt metilate postranscripțional, 80% din metilare avînd loc la atomul $C_{2'}$ al ribozei iar restul de 20% la nivelul bazelor azotate. După mărimea lor speciile moleculare de *r*RNA se împart în :

— *specii moleculare mari de rRNA* separate de la bacterii, plante și animale cu mase moleculare de $1{,}1 \times 10^6$, $1{,}3 \times 10^6$ și $1{,}7 \times 10^6$ daltoni și constante de sedimentare de 23, 25, 28 și 30S, cuprinzînd aproximativ 5 000 de nucleotide ;

— *speciile moleculare mici de rRNA* separate din aceleași surse cu mase moleculare de $0{,}56 \times 10^6$ și $0{,}7 \times 10^6$ daltoni și constante de sedimentare de 16S la bacterii, 18S la plante și animale ; algele au un *r*RNA asemănător cu cel al bacteriilor, iar dinoflagelatele cu cel al plantelor. În scara filogenetică se observă o tendință către creșterea conținutului de GC ceea ce a condiționat o creștere a regiunilor din moleculă cu structură secundară, fapt confirmat experimental.

Speciile moleculare mari de rRNA. *RNA 23S.* Izolat din celulele de *E. coli* acest tip de acid ribonucleic ribozomal, cu excepția prezenței unor nucleotide metilate, nu prezintă nici un fel de alte asemănări cu RNA 16*S* și stabilirea structurii lui primare este în curs. Preparatul de RNA 23*S* izolat de F e l l n e r (1969) conține 11 nucleotide metilate, care, probabil, se repetă de două ori în aceeași moleculă alcătuind aproximativ 5% din totalul nucleotidelor, ceea ce sugerează autorului ideea că molecula este formată din două jumătăți identice.

RNA 16S. Din celulele de *E. coli* F e l l n e r (1969) a izolat un *r*RNA 16*S* și a reușit să identifice în structura lui prezența unor nucleotide metilate, dar într-o cantitate mult mai mică decît în moleculele de *t*RNA.

Fellner și alții (1970) au arătat că *r*RNA 16*S* este alcătuit din aproximativ 1 680 ± 70 nucleotide, ceea ce corespunde masei moleculare determinată prin alte metode fizico-chimice. În prezent, aplicînd tehnicile hidrolizei enzimatice și a „amprentelor", imaginată de Sanger, cercetătorii încearcă să stabilească structura primară a acestui tip de *r*ARN.

Speciile moleculare mici de rRNA. *5SRNA.* Structura 5*S* RNA ribozomal izolat din *Escherichia coli* a fost stabilită în 1968 de Sanger și colab., folosindu-se metoda izotopilor marcați, digerarea preparatului în condiții experimentale variate cu ribonuclează T_1 și *A*, metilarea parțială a produselor rezultate și separarea oligonucleotidelor obținute prin metodele ionoforezei și cromatografiei. Fracția ribozomală a 5*S* RNA, a cărei funcție exactă în celulă rămîne necunoscută (deși se presupune că intervine în biosinteza proteinelor, date experimentale directe nu există) conține un acid ribonucleic alcătuit din 120 nucleotide, din care lipsește cu desăvîrșire orice bază „rară" sau „neobișnuită" și are o masă moleculară de 41 000 daltoni. Acest RNA se deosebește deci de tipurile de *t*ARN, care conțin aproximativ 75—85 nucleotide și sînt bogate în baze azotate „neobișnuite".

Secvența bazelor azotate și a punților de hidrogen între bazele perechi sînt redate în figura 5.7 din care se vede că în moleculă secvențele GCCGUAGCGC și CCCCAUGC se repetă de cîte două ori. După opinia împărtășită de mai mulți cercetători, diferitele părți ale structurii secundare a 5*S* RNA îndeplinesc funcții diverse: bucla I, alcătuită dintr-o secvență pentanucleotidică este socotită că se leagă de subunitatea ribozomală mare; bucla II este specie-specifică și rolul ei s-ar rezuma la menținerea ansamblului celor două subunități ribozomale; bucla III, alcătuită dintr-o secvență comună UGGG, printr-o pliere corespunzătoare dă naștere unei conformații spațiale care-i permite să se împerecheze cu secvența comună GTΨCG prezentă în molecula de *t*RNA și anume în bucla IV a acesteia. Sirlin (1972) afirmă că structurile de ordin superior ale moleculelor de 5S RNA rămînînd necunoscute, funcțiile prescrise rămîn în întregime ipotetice.

5*S* RNA este întîlnit în toate tipurile de ribozomi, dar se găsește în cantitate mică sau deloc în ribozomii mitocondriilor; este de origine extranucleolară și în ribozom este legat prin intermediul Mg^{2+} și a proteinelor ribozomale specifice de subunitatea 50*S*-ribozomală.

Moleculele de 5*S* RNA sînt 60% sub formă de helix și pentru structura lor secundară au fost propuse mai multe modele (fig. 5.7); structura lor terțiară, conform studiilor hidrodinamice, este rigidă și asimetrică.

Din ribozomii de *E. coli* separați cînd microorganismul se găsea în faza de creștere exponențială, Rosset, Monier, Julien (1964) au izolat un *r*RNA, alcătuit din 105 nucleotide, cu o masă moleculară de 36 000, metabolic stabil și diferit din punct de vedere al compoziției chimice de *r*RNA-16*S*, *r*RNA-23*S* și de *t*RNA. Acest *r*RNA este prezent în ribozomii 70*S* în proporție o moleculă/un ribozom, nu conține pseudouridină, și nici baze metilate; ambele extremități ale moleculei —3′ și 5′ — se termină printr-un rest de UMP. Cînd ribozomii 70S disociază în prezența soluțiilor de Mg^{2+} 10^{-4} *M* în subunități 30*S* și 50*S*, acest tip de *r*RNA rămîne atașat la subunitatea 50S a ribozomului.

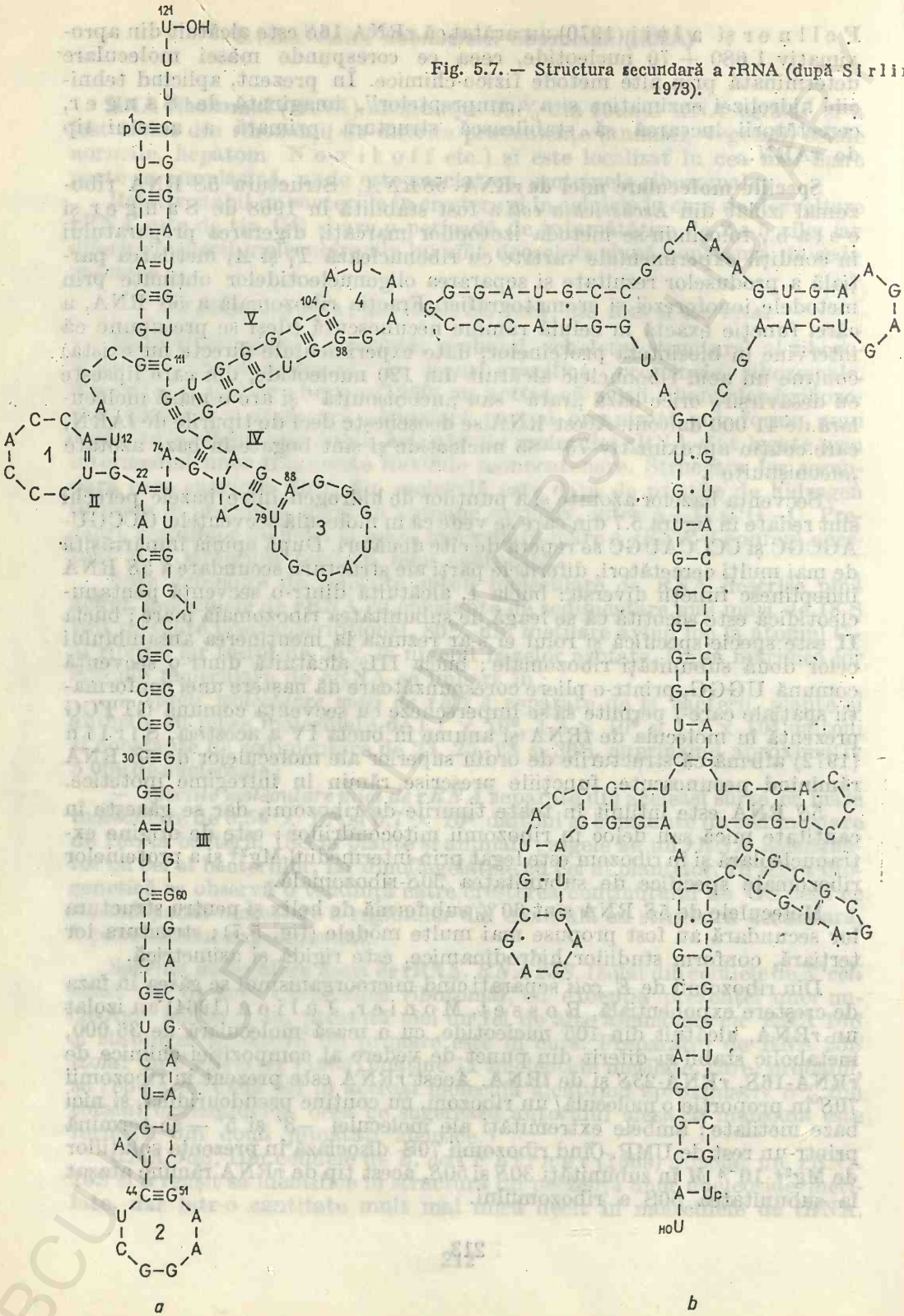


Fig. 5.7. — Structura secundară a rRNA (după S i r l i
1973).

a b

Forget și Weissmann (1967) au izolat, de asemenea, din celulele KB un 5*S*-RNA alcătuit din 120 nucleotide și prezentînd multe asemănări cu RNA-5*S* izolat de la *E. coli*. Aceste asemănări au dat naștere la două ipoteze interesante: pe de o parte existența unui tip ancestral de RNA-5*S* din care s-au desprins tipurile actuale în cursul evoluției (Ebel, 1972) și pe de altă parte, posibilitatea ca regiunile omoloage ale celor două molecule de RNA-5*S* (din *E. coli* și din celulele KB) să fie rezultatul unui proces de duplicare genică sau al unei evoluții convergente (Woese, 1968).

În subunitățile ribozomice 50—60*S* se află, de asemenea, o fracție RNA 5*S* a cărei funcție rămîne necunoscută.

5,5*S* RNA este o specie moleculară alcătuită din 130 de nucleotide și întîlnită numai în ribozomii organismelor superioare; ea formează aproximativ 1% din RNA celular și este legată prin legături de hidrogen cu cîteva baze ale moleculei de 28*S* RNA formînd un superedificiu molecular.

King și Gould (1970), Pene și colab. (1968) care au studiat acest tip de RNA nu au putut preciza structura și funcțiile lui sau influența lui asupra moleculei de 28*S* RNA.

8S RNA nucleolar descris pentru prima dată în celulele hepatomului Novikoff este localizat în nucleol, unde este unit prin legături de hidrogen cu 28*S* RNA. Este sintetizat cu o viteză relativ scăzută, nu este metilat și funcția lui este necunoscută.

RNA ribozomal al cloroplastelor și mitocondriilor. În aceste formațiuni infracelulare RNA de la eucariote se caracterizează printr-un procent mai mic de GC în comparație cu *r*RNA citoplasmatic. La eucariotele superioare speciile moleculare de *r*RNA mitocondrial sînt de dimensiuni mici — 13 și 21 *S* la *Xenopus laevis* și 13 — 17*S* la șobolan, ca dealtfel și *r*RNA din cloroplaste — 16 pînă la 23*S* — iar din punct de vedere al compoziției chimice apropiate de *r*RNA bacteriilor.

7*S* RNA din bacterii. În celulele bacteriene a fost descoperit un nou tip de RNA, omogen, lipsit de capacitatea de a acila aminoacizii, stabil metabolic și cu o masă moleculară de aproximativ 55 000 daltoni. Descris pentru prima dată de Hindley în 1967 acest tip de RNA este sintetizat la bacterii cu viteze destul de mari, dar funcția lui în celulă rămîne necunoscută.

4—7*S* RNA nuclear și nucleolar. Aceste specii moleculare de RNA sînt alcătuite din 100—180 de baze azotate, formează aproximativ 0,5% din totalul RNA celular, au un conținut ridicat de GC (variabil între 48 și 60% din bazele azotate), sînt puternic metilate și perioada lor de înjumătățire variază de la o zi pînă la mai multe zile. Sînt specii moleculare neribozomale care se întîlnesc numai la eucariote unele fiind localizate cu preponderență în nucleoli, iar altele în cromozomi. După Sirlin una din funcțiile posibile ale acestor specii moleculare ar consta în participarea lor la reglarea procesului de transcripție.

RNA labil nuclear al eucariotelor se întîlnește în nucleul celulelor animale în cantități de aproximativ 1% din totalul RNA celular și este absent la procariote. Se presupune că RNA labil este mai degrabă un precursor al

*m*RNA decît o specie moleculară distinctă sau că participă nemijlocit la reglarea complexă a genomului la eucariote.

Din punct de vedere al compoziţiei în baze azotate RNA labil se aseamănă cu *m*RNA : este de tip AU, aceste baze alcătuind aproximativ 44% din moleculă, constanta de sedimentare variază foarte mult, între 10—100*S*, masă moleculară ce depăşeşte 10^7 daltoni, perioada de înjumătăţire între 3 min. şi 1 h. Variaţia extrem de mare a constantei de sedimentare se explică probabil prin continua şi permanenta lui degradare, fiind mult mai instabil decît *m*RNA. Ca şi acesta, RNA labil nu conţine baze rare.

P e n m a n n şi a l ţ i i (1968) lucrînd pe celule de HeLa au descoperit în citoplasma acestora un *RNA labil polidispers* cu constanta de sedimentare variabilă între 10 şi 90S, care după opinia, neconfirmată experimental, a lui S i r l i n (1972) ar fi un derivat al RNA labil localizat în nucleu.

RNA labil mitocondrial descoperit de A t t a r d i şi A t t a r d i (1967) în polizomii fixaţi pe membranele reticulului endoplasmatic al celulelor de HeLa formează aproximativ 1% din RNA total din citoplasmă şi sub raport analitic este deosebit de eterogen (6—50*S*). Compoziţia în baze azotate este de tipul GC, aceste două baze alcătuind aprox. 43%, ceea ce ar indica o structură complementară catenei grele a DNA mitocondrial. Acest tip de RNA se deosebeşte de *m*RNA printr-o perioadă de înjumătăţire de 30 min., un raport înalt A/U, precum şi prin viteze de transcripţie diferite de ale RNA nuclear şi *r*RNA din citoplasmă. Existenţa lui este pusă la îndoială deoarece el poate fi identic RNA labil din citoplasmă.

RNA cromozomal sau depresor a fost descoperit în cromatina eucariotelor şi formează aproximativ 1—2% din totalul RNA celular. Plecînd de la observaţia că acest tip de RNA este absent în nucleii inactivi B o n n e r şi c o l a b. presupun în 1968 că el poate îndeplini funcţia de depresor al genomului. Din punct de vedere biochimic această specie moleculară de RNA este parţial organ-specifică, alcătuită din circa 50 nucleotide, de tipul AU şi metilată într-o proporţie redusă ; în celulă este legată covalent de o proteină cromozomală acido-solubilă sau prin punţi de hidrogen de histonele nucleare.

Homopolimeri. S h a t k i n d evidenţiază în 1969 faptul că 1/4 din RNA reovirusului este alcătuită dintr-o catenă alcătuită din 15 nucleotide — poli *A*. Virusurile conţin şi ele homopolimeri, dar se pare că aceştia sînt prezenţi în celulele infectate însă lipsesc în virioni. E d m o n d s şi C a r a m e l a (1969) descriu pentru nucleii celulelor ascitice un polinucleotid alcătuit în proporţie de 90% din adenină, cu o constantă de sedimentare de 8—10 S şi cuprinzînd circa 300 nucleotide. Prezenţa homopolimerilor de tipul poli*A* a fost ulterior evidenţiată şi în nucleii vertebratelor şi la bacterii. De semnalat faptul că sinteza poli *A* din nucleu nu este dependentă de DNA deoarece este indiferentă faţă de acţiunea actinomicinei.

În macromoleculele de *m*RNA, *n*RNA, şi în RNA virionilor au fost descoperite fragmente (blocuri) de poli *A* legate covalent. Ulterior, fragmentele de poli *A* alcătuite din 100—200 de nucleotide au fost considerate ca o trăsătură caracteristică a RNA nuclear eterogen al eucariotelor şi anume a acelei părţi a moleculei care este apoi transportată în citoplasmă sub formă de *m*RNA. După anul 1970 identificarea de *m*RNA care conţin

fragmente de poli *A* legate covalent a demonstrat răspîndirea acestora la toate eucariotele; la bacterii a fost descoperită ATP-polimeraza care sintetizează poli *A* și polinucleotidul se găsește în stare liberă în celulă. Fragmentele de poli *A* conțin între 50—70 pînă la 150—200 nucleotide și conținutul fracției RNA bogată în poli *A* este variabil, alcătuind 1% la drojdii, 3% în celulele de HeLa, 5—7% în creier, 3—9% în țesuturile vegetale etc (% din totalul RNA celular). Fragmente de poli *A* unite covalent cu RNA au fost găsite în *m*RNA virusurilor animale care conțin DNA, în *m*RNA virusurilor ce conțin RNA, ceea ce a condus la formularea ipotezei că aceste fragmente de poli *A* identificate în aproape toate moleculele de *m*RNA, indiferent de proveniența lor, au o oarecare legătură cu proprietățile biologice ale moleculelor de *m*RNA. Totuși există și unele excepții, de exemplu, cele descrise de Greenberg (1972) pentru *m*RNA care participă la sinteza histonelor și de Stoltzfus și alții (1973) pentru RNA polizomal al reovirusurilor care nu conțin poli *A*.

Biosinteza de poli *A*-RNA se desfășoară după opinia majorității cercetătorilor (v. Zerov, 1976) în nucleu, mitocondrii și citoplasmă și poate avea loc anterior procesului de transcripție prin copierea unor fragmente de poli*T* și poli*U* din macromolecula de DNA sau după încheierea acestui proces cînd fragmentele de poli*A* se unesc pe cale enzimatică și covalent la extremitatea 3'a moleculei de RNA.

Cu privire la funcția fragmentelor de poli*A* menționăm unele ipoteze interesante, parțial confirmate experimental:

— participă la „maturarea" și la transportul moleculelor de *m*RNA, deoarece din moleculele *m*RNA eterogen se formează *m*RNA citoplasmatic;

— stabilizează *m*RNA, deoarece moleculele de *m*RNA, la eucariote, au o perioadă de înjumătățire mult mai lungă decît *m*RNA bacterian, lipsit de poli*A*;

— îndeplinește un rol încă neprecizat în procesul de translație, inițiind, probabil, translația în calitate de centru de recunoaștere a ribozomului și de legare a *m*RNA de subunitățile acestuia; s-a constatat că lungimea fragmentului de poli*A* scade în timpul translației, ceea ce a condus la ideea că lungimea poli*A* constituie un semnal care determină numărul de cicluri de translație pe care o moleculă de *m*RNA este capabilă să-l realizeze;

— la virusurile oncogene și neoncogene rolul poli*A* din structura RNA este, după opinia cercetătorilor, multiplu: formează spirale duble cu regiunile poli*U*, inițiază sinteza DNA dependent de RNA (transcripția inversă), este în strînsă legătură cu procesul de oncogeneză, în cursul procesului de translație determină formarea de polilizină, iar aceasta constituie semnalul maturării proteinelor virale, maschează RNA viral sub formă de *m*RNA celular în timpul sintezei în nucleu și al trecerii lui în citoplasmă (v. Zerov, 1976).

Din cele de mai sus reiese clar că fragmentele de poli*A* prezente în moleculele de RNA celular, viral, nuclear și citoplasmatic sînt plurifuncționale și precizarea rolului lor în reglarea proceselor biochimice din celule este o problemă de viitor*.

* V. și cap. 21—Structura primară a *m*RNA care participă la biosinteza catenelor β ale hemoglobinei.

5.1.6 Acidul deoxiribonucleic (DNA)

Acidul deoxiribonucleic este un *polimer macromolecular alcătuit din nucleotide ale deoxiribozei*, cu o masă moleculară ce variază între 10^6 și 10^9 și localizat aproape exclusiv în nucleul celular sub formă de *deoxiribonucleoproteide*. La eucariote DNA nuclear se găsește într-o cantitate de aproximativ 2 mg./g țesut umed și poate fi găsit, în cantități mult mai mici în mitocondrii și în citoplasmă. Bacteriile și unele virusuri conțin, de asemenea, DNA dar acesta nu este localizat într-o structură morfologică definită.

Cantitatea de DNA în celulele unei specii date este întotdeauna constantă și funcție de numărul de *cromozomi*. În cursul diviziunii celulare cantitatea de DNA se dublează pentru ca în mitoză să se reducă la jumătate și celulele-fiice diploide să conțină aceeași cantitate de DNA ca și *celulele parentale* caracteristice speciei. În *celulele haploide* (gameți) cantitatea de DNA este înjumătățită deoarece prin fecundare are loc restabilirea cantității de DNA specifică speciei respective, după cum în *celulele poliploide* cantitatea DNA corespunde gradului de poliploidie a speciei.

Aceste date experimentale au determinat pe Astbury (1939) să emită ipoteza că *acizii nucleici îndeplinesc un rol important în celulă*, confirmat ulterior de Avery, Colin, McLeod și McCarty (1944) în experiențele de transformare *indusă a pneumococilor*. În același sens pledau și experiențele lui Griffith (1928) efectuate pe *Diplococcus pneumoniae*, tipul virulent *R II* (rough) capabil să transmită descendenților însușirile lor. Revelatoare sînt și experiențele și ipotezele emise de Boivin, Vendrely și Vendrely (1948).

Numeroase dovezi experimentale directe privind *rolul DNA în ereditate* au fost obținute după anul 1952 și îndeosebi după formularea de către Watson și Crick (1953 *a*, *b*) și de Wilkins, Stokes și Wilson (1953) a modelelor de structură moleculară a acizilor nucleici.

Compoziția chimică a DNA. Macromoleculele de DNA din celule sînt alcătuite din unități mononucleotidice ale deoxiribozei *d*AMP, *d*GMP, *d*TMP și *d*CMP legate între ele prin punți fosfodiesterice 3′→5′ (fig. 5.8). Compoziția macromoleculelor de DNA în baze azotate purinice și pirimidinice este caracteristică pentru fiecare organism și rămîne aceeași indiferent de vîrstă, de condițiile fiziologice sau de condițiile ecologice. Sparrow și colab. (1976), analizînd conținutul DNA în genomul a peste 1 100 de specii de plante superioare și 1 300 specii de plante inferioare constată că toate organismele cu o cantitate de DNA în genom mai mică de 5×10^{-3}pg sînt procariote, iar cele care au o cantitate mai mare de $3{,}6 \times 10^{-2}$pg sînt eucariote (tabelul 5.6). Sparrow emite ipoteza că dublarea genomului a jucat un rol important în evoluție ca mijloc al dezvoltării independente a procariotelor primitive, prin creșterea în dimensiuni a genomului și a eucariotelor prin creșterea numărului de genoame, evoluția producîndu-se de la un „procariot" ancestral.

Din contră, compoziția în baze azotate a DNA variază de la o specie la alta, după cum variabile sînt și secvența unităților mononucleotidice și masa moleculară sau structurile chimice superioare structurii primare. De exemplu, la bacterii singurul tip de moleculă de DNA este

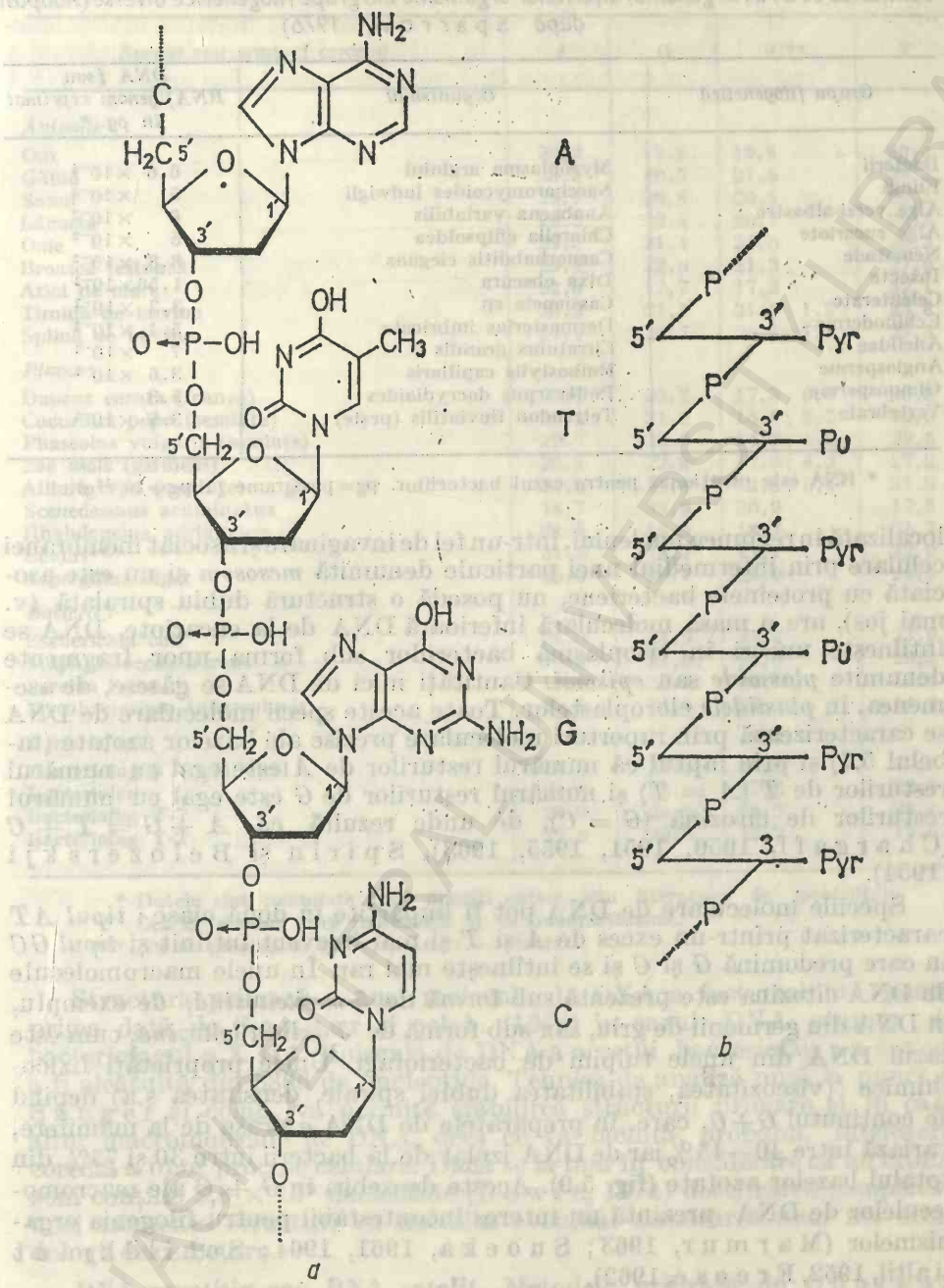


Fig. 5.8. — Secvența resturilor de nucleotide din macromolecula DNA: *a* — structura primară a DNA; *b* — schema legăturilor $C_{3'}-C_{5'}$ dintre mononucleotidele care alcătuiesc molecula.

TABELUL 5.6

Cantitatea de DNA în genomul diferitelor organisme din grupe filogenetice diverse (Adaptat după Sparrow, *1976)*

Grupa filogenetică	*Organismul*	*DNA (sau RNA)/genom exprimat în pg.* *
Bacterii	Mycoplasma arginini	$6{,}6 \times 10^{-4}$
Fungi	Saccharomycoides ludwigii	5×10^{-3}
Alge verzi-albastre	Anabaena variabilis	6×10^{-3}
Alge eucariote	Chlorella ellipsoidea	5×10^{-2}
Nematode	Caenorhabditis elegans	$8{,}8 \times 10^{-2}$
Insecte	Dixa obscura	$1{,}56 \times 10^{-1}$
Celenterate	Cassiopeia sp.	$3{,}3 \times 10^{-1}$
Echinoderme	Dermasterias imbricata	$5{,}4 \times 10^{-1}$
Anelidae	Cirratulus grandis	7×10^{-1}
Angiosperme	Bulbostylis capillaris	$3{,}6 \times 10^{-1}$
Gimnosperme	Podocarpus dacrydioides	5,3
Vertebrate	Tetraodon fluviatilis (pește)	$3{,}9 \times 10^{-1}$

* RNA este menționat pentru cazul bacteriilor. pg=picograme (1 pg=10^{-12}g).

localizată în regiunea nucleului, într-un fel de invaginare și asociat membranei celulare prin intermediul unei particule denumită *mesosom* și nu este asociată cu proteinele bacteriene, nu posedă o structură dublu spiralată (v. mai jos), are o masă moleculară inferioară DNA de la eucariote. DNA se întîlnește uneori în citoplasma bacteriilor sub forma unor fragmente denumite *plasmide* sau *episomi*. Cantități mici de DNA se găsesc, de asemenea, în *plastidele* cloroplastelor. Toate aceste specii moleculare de DNA se caracterizează prin raporturi moleculare precise ale bazelor azotate (tabelul 5.7) și prin faptul că numărul resturilor de A este egal cu numărul resturilor de T ($A = T$) și numărul resturilor de G este egal cu numărul resturilor de citozină ($G = C$), de unde rezultă că $A + G = T + C$ (Chargaff, 1950, 1951, 1955, 1963), Spirin și Belozerskji (1954).

Speciile moleculare de DNA pot fi împărțite în două clase : *tipul AT* caracterizat printr-un exces de A și T și mai frecvent întîlnit și *tipul GC* în care predomină G și C și se întîlnește mai rar. În unele macromolecule de DNA citozina este prezentă sub formă de *5-metilcitozină*, de exemplu, în DNA din germenii de grîu, sau sub formă de *5-oximetilcitozină*, cum este cazul DNA din unele tulpini de bacteriofagi. Unele proprietăți fizico-chimice (viscozitatea, stabilitatea dublei spirale, densitatea ș.a) depind de conținutul $G+C$, care, în preparatele de DNA extrase de la mamifere, variază între 40—45% iar de DNA izolat de la bacterii între 30 și 75% din totalul bazelor azotate (fig. 5.9). Aceste deosebiri în $G + C$ ale macromoleculelor de DNA prezintă un interes incontestabil pentru filogenia organismelor (Marmur, 1963; Suoeka, 1961, 1964; Schildkraut și alții, 1952, Freese, 1962).

Succesiunea deoxiribonucleotidelor în catenele DNA alcătuiește *structura primară a DNA*.

TABELUL 5.7

*Echivalența bazelor azotate în diferite preparate de DNA, exprimată procentual în moli**

Specia sau organul cercetat	*A*	*G*	*C***	*T*
Animale:				
Om	30,9	19,9	19,8	29,4
Găină	28,8	20,5	21,5	29,2
Somn	29,7	20,8	20,4	29,1
Lăcustă	29,3	20,5	20,7	29,3
Oaie	29,3	21,4	21,0	28,3
Broască țestoasă	29,7	22,0	21,3	27,9
Arici de mare	32,8	17,7	17,3	32,1
Tiroidă de bovine	28,2	21,5	21,2; 1,3	27,8
Splină de bovine	27,9	22,7	20,8; 1,3	27,3
Plante:				
Daucus carota (frunze)	26,7	23,2	17,3; 6,0	26,8
Cucurbita pepo (semințe)	30,2	21,0	16,1; 3,7	29,0
Phaseolus vulgaris (semințe)	29,7	20,6	14,9; 5,2	29,6
Zea maïs (germeni)	26,8	22,8	17,0; 6,2	27,2
Allium cepa (semințe)	31,8	18,4	12,8; 5,4	31,3
Scenedesmus acuminatus	18,7	32,9	30,9	17,5
Rhabdonema adriaticum	31,4	18,6	18,3	31,7
Levuri***	31,3	18,7	17,1	32,9
Aspergillus niger	25,0	25,1	25,0	24,9
Bacterii:				
Escherichia coli	26,0	24,9	25,2	23,9
Staphylococcus aureus	30,8	21,0	19,0	29,2
Sarcina lutea	13,4	37,0	37,1	12,4
Mycobacterium tuberculosis	15,1	34,5	35,4	14,6
Bacteriofagi:				
Bacteriofag φ X 174 viral	24,3	24,5	18,2	32,3
Bacteriofag	21,3	28,6	27,2	22,9
Bacteriofag *T*-7	26,0	24,0	24,0	26,0
Bacteriofag *T*-2	32,6	32,6	18,2	16,6

* Datele sînt compilate după diferiți autori, din literatura de specialitate.
** Cea de a doua cifră reprezintă % de 5-metilcitozină.
*** Nu se precizează specia pe care s-a lucrat.

Structura primară a unei molecule de DNA a fost stabilită pentru prima dată de Sanger și colab. (1978) în cazul DNA obținut din bacteriofagul φ X 174. Molecula de DNA a acestui bacteriofag s-a dovedit a fi alcătuită din 5386 de nucleotide. Tehnica de analiză pusă la punct de Sanger și colab. va permite stabilirea structurii primare și în cazul altor macromolecule de DNA, ceea ce va facilita, probabil, înțelegerea corectă a unor procese celulare. Dacă se ia însă în considerare că un cromozom conține $2{,}8 \times 10^9$ nucleotide (Lewin, 1974) descifrarea completă a unei asemenea structuri va necesita eventual elaborarea unor noi metodologii de cercetare.

DNA repetitiv sau DNA satelit. Metodele utilizate de Chargaff (1963), Spencer și Chargaff (1963), Shapiro și Chargaff (1964), Burton și alții (1963), Tonnes și Walker (1964) de hi-

droliză în mediu acid a DNA cu obținerea unor polimeri în care nucleotidele purinice se găsesc sub formă de resturi deoxiribozice, denumite *acizi apurinici*, au deschis calea spre identificarea în această macromoleculă a structurii unor oligonucleotide alcătuite din baze pirimidinice și a stabilirii frecvenței cu care aceste fragmente se repetă. La eucariote DNA

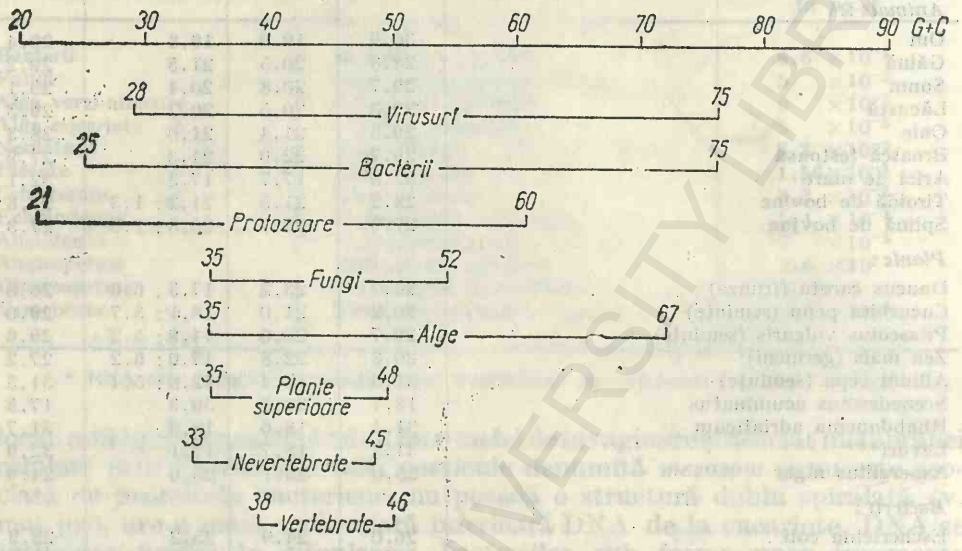


Fig. 5.9. — Limitele de variație ale conținutului G+C în DNA la diferite grupe de organisme.

celular poate fi împărțit în funcție de structura lui în trei categorii : unic, intermediar și repetitiv. DNA repetitiv prezent în regiunea centromerilor tuturor cromozomilor, cu excepția cromozomului *Y*, reprezintă între 20% și 80% din cantitatea totală de DNA celular și constă din aproximativ 1 milion de cópii ale unei secvențe polinucleotidice alcătuite din numai 300 de perechi de nucleotide. Astfel, de exemplu, DNA repetitiv la batracianul *Necturus* reprezintă 90%, la *Xenopus laevis* — 45%, la taurine — 45% iar la *Drosophila melanogaster*—15% din totalul DNA celular.

B r i t t e n și K o h n e (1970) au arătat că DNA repetitiv din heterocromatină este eterogen, existînd molecule de DNA repetitiv bogate în adenină și timină, iar altele bogate în guanină și citozină.

Acest tip de DNA este prezent în lumea animală la protozoare, spongieri, celenterate, moluște, insecte, amfibieni, pești, păsări, mamifere și la primate, iar în regnul vegetal, de la algele verzi pînă la plantele cultivate de om. Chiar și genomul uman care constă din 7×10^9 baze perechi conține 35% din aceste baze în secvențe repetitive (S a u n d e r s și a l ț i i (1972))

Rolul îndeplinit de DNA repetitiv în celulă este în prezent mult discutat. Unii autori presupun că el îndeplinește un rol deosebit în realizarea structurii moleculare a cromozomului la eucariote, determinînd tipul caracteristic de răsucire a fibrelor cromozomiale, alții că ar participa la condensarea cromozomilor și, în sfîrșit, că DNA repetitiv spațiază între ele genele și este „important pentru că nu face nimic" (O h n o, 1970).

În privința DNA intermediar W a l k e r (1971) emite ipoteza că acesta poate reprezenta un DNA repetitiv de origine ancestrală și ar participa la codificarea familiilor de proteine înrudite structural (v. R a i c u și alții, 1974). El menționează că acest tip de DNA întîlnit în toate organismele superioare studiate posedă mai multe „familii de secvențe repetitive", iar DNA satelit rapid un număr și mai mare de astfel de secvențe. Speciile animale apropiate filogenetic conțin cantități foarte diferite de DNA satelit (*Mus musculus* — 12%, *Microtus agrestis* — 6%, *Rattus rattus* — 10%, *Apodemus mystacinus* — 5% etc.) și nu există o corelare între importanța genomului (dimensiune și număr de cromozomi) și procentul de DNA satelit.

Configurația moleculei de DNA. Modelul lui Watson și Crick. Studiul structurii moleculare a DNA s-a realizat în principal cu ajutorul metodei de difracție a razelor *X* de către A s t b u r y (1947), F r a n k l i n și G o s l i n g (1953), W i l k i n s, S t o k e s și W i l s o n (1953) aplicată pe preparate înalt purificate. Preparatele de DNA pot fi obținute în două forme diferite : *forma A* care conține aproximativ 45% apă și prin difracția de raze *X* dă o *roentgenogramă de tip cristalin*, ceea ce indică o *conformație tridimensională* a moleculei și *forma B*, în care conținutul de apă este mai mare și care este considerată a fi mai importantă din punct de vedere biologic, care dă o *roentgenogramă paracristalină*, ceea ce înseamnă că moleculele de DNA sînt așezate aproximativ paralel una față de cealaltă, dar nu într-o ordine extrem de riguroasă ca într-un cristal al unei substanțe chimice oarecare.

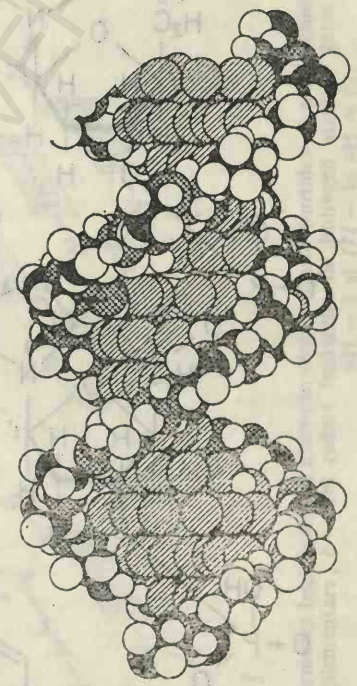
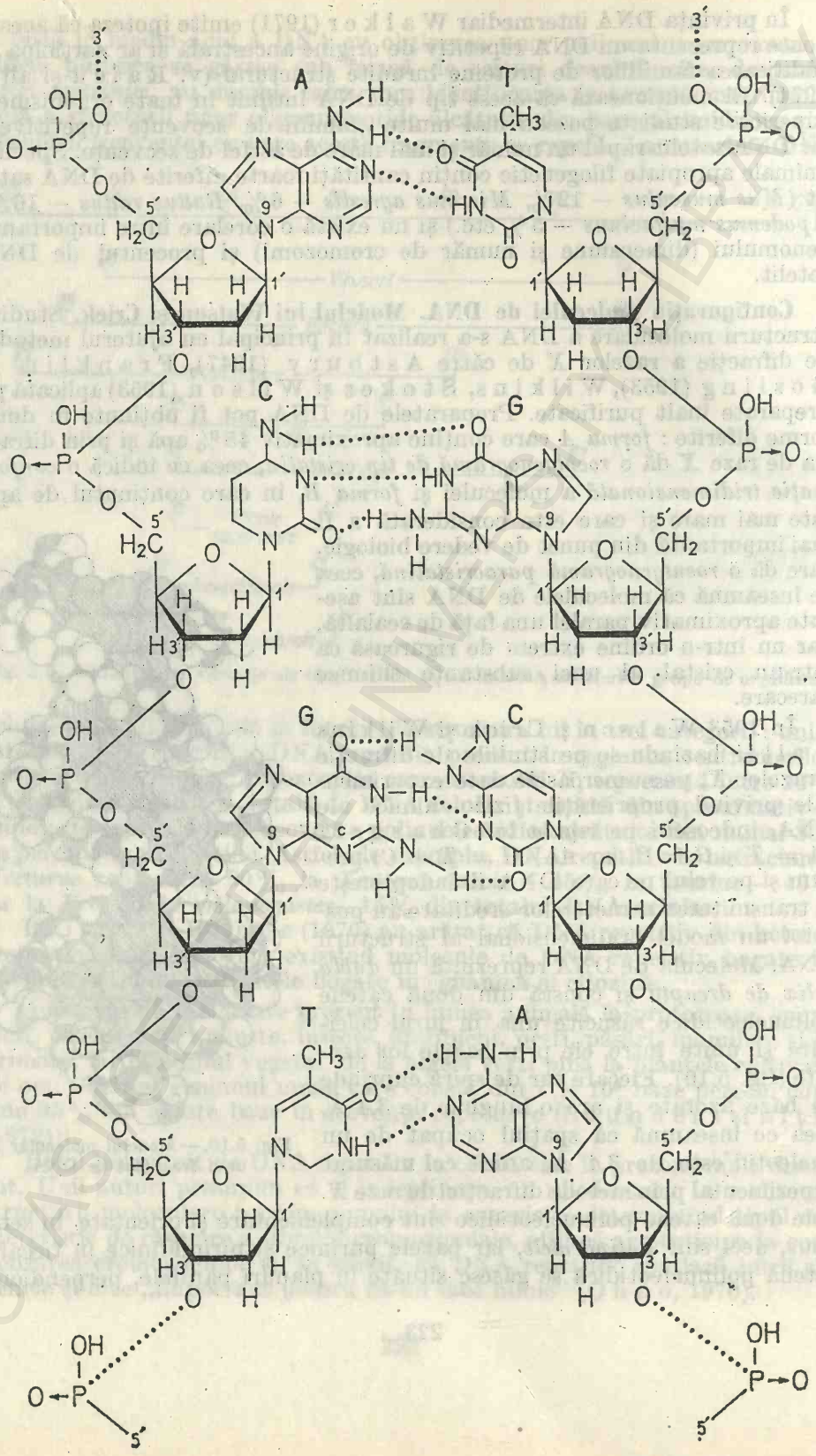


Fig. 5.10. — Modelul molecular al unui fragment de DNA.

În 1953 W a t s o n și C r i c k și W i l k i n s și a l ț i i bazîndu-se pe studiile de difracție a razelor *X*, pe numeroasele date experimentale privind proprietățile fizico-chimice ale DNA, îndeosebi pe *regula lui* C h a r g a f f ($A = T$ și $G = C$, iar $A + G = T + C$) precum și pe rolul pe care DNA îl îndeplinește în transmiterea caracterelor ereditare au postulat un model tridimensional al structurii DNA. Molecula de DNA reprezintă un *dublu helix de dreapta* și constă din două catene polinucleotidice răsucite una în jurul celeilalte și unite între ele prin bazele lor azotate (fig. 5.10). Fiecare tur de spiră cuprinde 10 baze azotate și are o lungime de 3,4 Å, ceea ce înseamnă că spațiul ocupat de un nucleotid este de 3,4 Å, adică cel măsurat experimental prin metoda difracției de raze *X*. Cele două catene polinucleotidice sînt complementare și orientate în sens opus, deci sînt *antiparalele*, iar bazele purinice și pirimidinice în fiecare catenă polinucleotidică se găsesc situate în planuri paralele, perpendicu-


A
T
C
G
G
C
T
A

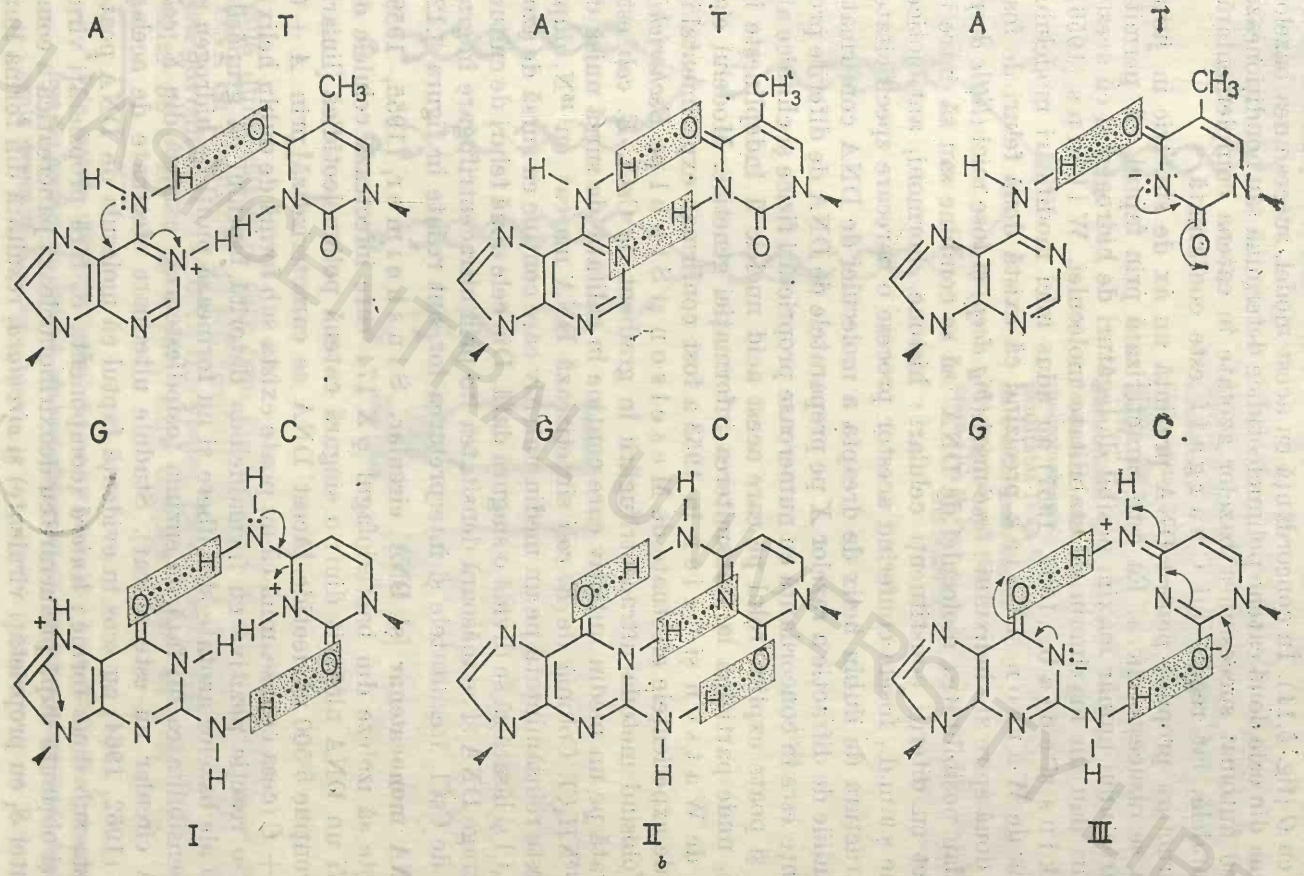


Fig. 5.11, *a* — Formarea legăturilor de hidrogen dintre bazele purinice și pirimidinice care conduc la crearea unor catene polinucleotidice complementare; *b* — sînt redate legăturile de hidrogen stabilite între bazele azotate; *I* — la *p*H = 3; *II* — la *p*H = 7 și *III* — la *p*H = 12.

BCU IAȘI CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

lare pe axul dublului helix. Bazele unor catene polinucleotidice sînt perechi cu bazele catenei polinucleotidice complementare şi sînt situate în aceleaşi planuri, formînd *baze-perechi* şi dînd naştere *legăturilor de hidrogen* dintre catene. Studiul detaliat al formării legăturilor de hidrogen între bazele azotate din structura DNA a arătat că *A* formează pereche cu *T*, iar *C* cu *G* (fig. 5.11). În concordanţă cu acest model, succesiunea bazelor într-una din cele două catene polinucleotidice determină sau condiţionează în mod automat succesiunea bazelor azotate în catena complementară, antiparalelă, iar regula lui Chargaff este confirmată.

Structura propusă pentru DNA prezintă un ax de simetrie în jurul căruia se răsuceşte elicea. Ea este caracterizată prin faptul că permite formarea unui număr maxim posibil de legături de hidrogen şi că aceste legături dau un maximum de stabilitate moleculei. Wilkins (1956), Wilkins şi colab. (1955, 1957) au adus mici modificări modelului propus de Watson şi Crick precizînd că există două feluri de fose între două spire ale helixului : fose mari (*big deep*) şi fose mici (*little deep*) care dau posibilitatea moleculei de DNA să se combine sau să intre în contact cu diferiţi constituenţi celulari : histone, hormoni, antibiotice, enzime ş.a.m.d., fosele conferind acestor procese o oarecare specificitate.

Structura de dublu helix de dreapta a moleculei de DNA confirmată de studiile de difracţie a razelor *X* pe preparatele de DNA de diferite proveniente este în concordanţă cu numeroase proprietăţi fizice şi chimice ale DNA şi poate explica rolul pe care acest acid nucleic îl îndeplineşte în celulă, unde participă la transmiterea informaţiei genetice. Modelul elaborat de Watson şi Crick în 1953 a fost confirmat experimental în 1958 de experienţele efectuate de Meselson şi Stahl pe *Escherichia coli*, folosind metoda ultracentrifugării în gradient de CsCl. *E. coli* este cultivată pe un mediu nutritiv care conţine în calitate de sursă unică de azot $^{15}NH_4Cl$. Colonia de *E. coli* sintetizează DNA marcat cu ^{15}N, după care este reînsămînţată pe un mediu nutritiv care conţine ca sursă de azot $^{14}NH_4Cl$ şi lăsată să se dividă o singură dată. Din cele două feluri de culturi se extrage DNA şi se măsoară densitatea lui prin ultracentrifugare în gradient de CsCl. Rezultatele şi interpretarea lor sînt redate în figura 5.12.

DNA monocatenar [şi DNA] circular. Sinsheimer, (1955, 1959) reuşeşte să izoleze din bacteriofagul [φX 174] care infectează celulele de *E. coli* un DNA alcătuit dintr-o singură catenă polinucleotidică [liniară] care conţine 5 500 nucleotide. [Acest] DNA se caracterizează] prin $A + G \neq T + C$ (ceea ce înseamnă că nu poate exista sub formă de dublu helix), printr-o reacţie pozitivă cu formaldehida datorită faptului că grupările amino ale bazelor azotate sînt libere şi nu formează punţi de hidrogen şi prin sensibilitatea lui faţă de enzima fosfodiesteraza extrasă din *E. coli* (DNA circular nu este atacat). Studiile ulterioare efectuate de acelaşi autor (1962, 1964) au scos în evidenţă faptul că molecula de DNA poate coexista sub două forme : *liniară* (componenta S_2 fără proprietăţi virulente şi obţinută după prelucrare cu deoxiribonuclează pancreatică a componentei S_1 cu proprietăţi virulente) şi *circulară*, rezultată din forma lini-

ară în urma apariției unei legături covalente între extremități (componenta S_1 virulentă) *.

Din virusul papilomului Shope, Cracaford (1964) izolează două forme de DNA cu mase moleculare identice însă cu constante de sedimentare diferite : 21*S* și 28*S*. Se presupune că DNA de 28*S* este o mole-

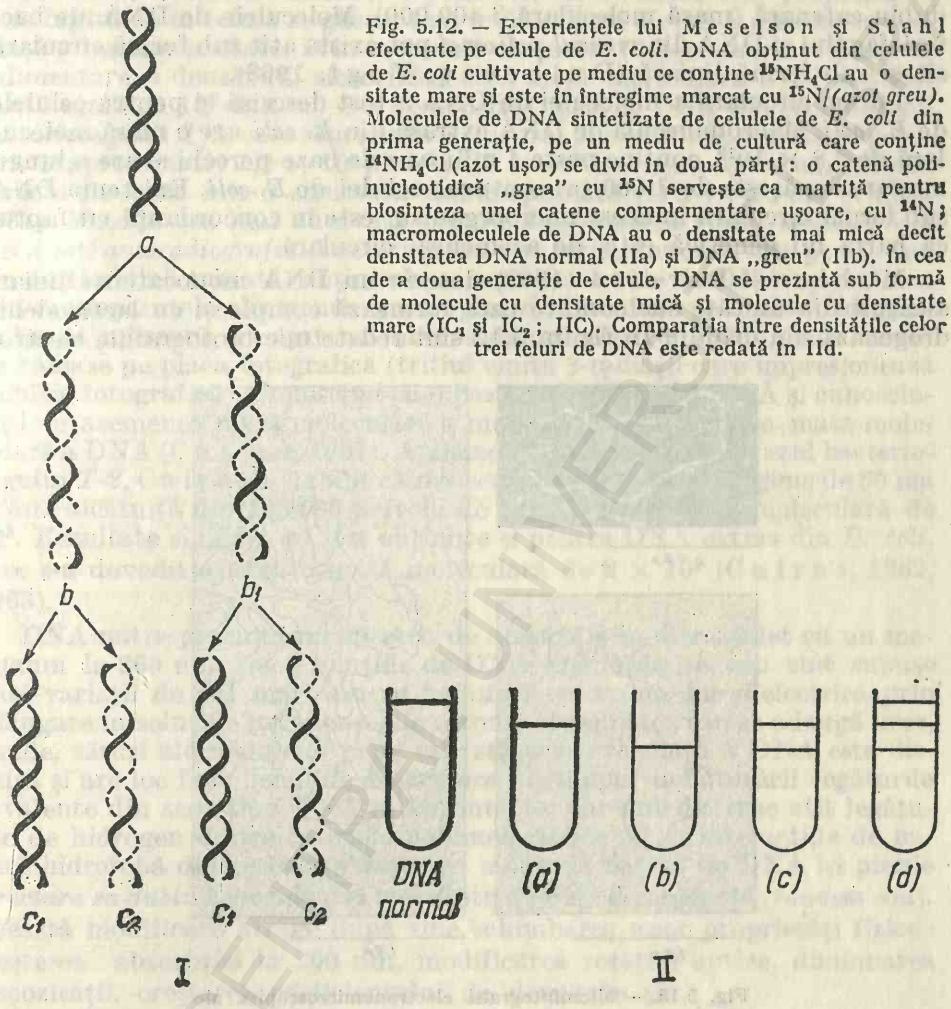


Fig. 5.12. — Experiențele lui Meselson și Stahl efectuate pe celule de *E. coli*. DNA obținut din celulele de *E. coli* cultivate pe mediu ce conține $^{15}NH_4Cl$ au o densitate mare și este în întregime marcat cu ^{15}N *(azot greu)*. Moleculele de DNA sintetizate de celulele de *E. coli* din prima generație, pe un mediu de cultură care conține $^{14}NH_4Cl$ (azot ușor) se divid în două părți : o catenă polinucleotidică „grea" cu ^{15}N servește ca matriță pentru biosinteza unei catene complementare ușoare, cu ^{14}N; macromoleculele de DNA au o densitate mai mică decît densitatea DNA normal (IIa) și DNA „greu" (IIb). În cea de a doua generație de celule, DNA se prezintă sub formă de molecule cu densitate mică și molecule cu densitate mare (IC_1 și IC_2 ; IIC). Comparația între densitățile celor trei feluri de DNA este redată în IId.

culă dublu-catenară care prin tratamentul experimental folosit trece în DNA cu constanta de sedimentare de 21S. O structură dublu catenară s-a dovedit a avea și DNA din virusul herpesului (masă moleculară a virusului $50 \times 10^6 - 60 \times 10^6$), care conține peste 68% $G + C$.

* Prin metoda ultracentrifugării Sinsheimer și alții (1962, 1964) reușesc să izoleze din preparatele de DNA ale bacteriofagului φX174, forma nevirulentă, două componente denumite S_1 și S_2.

Numeroşi bacteriofagi — fagul α care infestează *Bacillus megaterium*, fagul *SP8* care infestează *Bacillus subtilis*, fagii *A*, *B*, *C* şi *D*, parazitari pe *Bacillus cereus* — conţin DNA dublu spiralat, în timp ce fagii φ *R* şi *S*13 parazitari pe *E. coli* au DNA monocatenar.

La bacteriofagul φX *174 forma replicativă* DNA poate coexista sub forma circulară monocatenară (masă moleculară 1 700 000) şi circulară dublu catenară (masă moleculară 3 400 000). Moleculele de DNA ale bacteriofagului şi DNA din *virusul poliomei* pot exista atît sub formă circulară cît şi sub formă liniară (D u l b e c c q, V o g t, 1963).

Forma circulară a moleculei de DNA a fost descrisă şi pentru celulele de *E. coli*. Macromolecula de DNA extrasă din *E. coli* are o masă moleculară de 2,8 × 10^{10}, conţine peste 4 milioane de baze-perechi şi are o lungime care depăşeşte de 1 000 ori conturul celulei de *E. coli*. Existenţa DNA sub formă circulară în acest microorganism este în concordanţă cu faptul că harta lui genetică este, de asemenea, circulară.

M a h l e r şi P e r e i r a (1962) descriu un DNA monocatenar liniar, alcătuit din unităţi nucleotidice care formează complecşi cu lacticodehidrogenaza din drojdii. În figura 5.12 sînt redate microfotografiile electro-

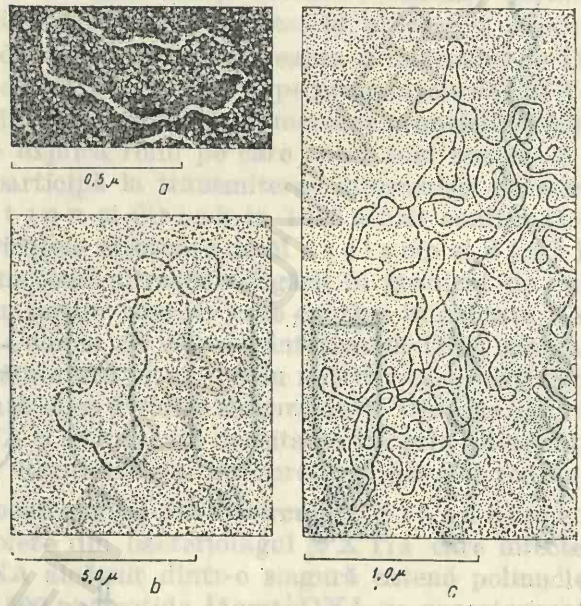


Fig. 5.13. — Microfotografii electronomicroscopice ale DNA monocatenar, liniar şi circular extras din fagii φX 174 (*a*), λ (*b*) şi *T2*(*c*).

nomicroscopice ale *DNA monocatenar*, *liniar* şi *circular*, extras din diferiţi bacteriofagi.

DNA circular dublu-catenar se întîlneşte şi în mitocondrii (4—6 molecule de DNA/mitocondrie) şi se deosebeşte de DNA celular prin compoziţia în baze azotate. Masa lui moleculară este de 1 milion sau un multiplu de 1 milion şi poate exista sub formă circulară ca *monomer* sau ca *dimer*, sau sub formă de *dimer catenat*.

Unele proprietăți fizice și chimice ale DNA. Moleculele native de DNA animal, vegetal și bacterian au *dimensiuni și mase moleculare mari* și nu pot fi obținute în stare intactă din cauza instabilității lor : simpla agitare sau pipetare determină *depolimerizarea materialului nativ* cu formarea de *fragmente* cu masă moleculară cuprinsă între 5 și 10 milioane. Determinarea exactă a masei moleculare prin metodele clasice este prejudiciată și de faptul că în celulă se găsesc mai multe tipuri de DNA diferite ca secvență a bazelor azotate. Prin metodele obișnuite (determinarea vitezei de sedimentare, a densității, viscozității etc.) masa moleculară a DNA a fost găsită egală cu 10^6 daltoni. S-a demonstrat însă că DNA din cromozomul bacteriofagului *T*/2, care reprezintă o singură „bucată" are o masă moleculară de aproximativ $1{,}2 \times 10^8$ pînă la $1{,}6 \times 10^8$ și conține aproxim. 200 000 perechi de baze într-o structură dublu-spiralată (D a v i d s o n și alții, 1961). Metoda cea mai adecvată pentru *determinarea masei moleculare a DNA este autoradiografia.* Bacteriile sau virusurile sînt cultivate pe un mediu cu timidină tritiată, obținîndu-se astfel molecule de DNA marcate cu tritiu ; preparatele electronomicroscopice sînt montate pe o placă fotografică și se măsoară, cu ajutorul microscopului electronic, lungimea urmelor rămase pe placa fotografică (tritiul emite β-radiații care impresionează emulsia fotografică). Cunoscînd că o bază azotată ocupă 3,4 Å și cunoscîndu-i de asemenea masa moleculară a nucleotidelor se deduce masa moleculară a DNA (C a i r n s, 1961). Aplicînd această metodă în cazul bacteriofagului *T-2*, C a i r n s a stabilit că molecula de DNA are o lungime de 50 mμ și este alcătuită din 195 000 perechi de baze și are o masă moleculară de 10^8. Rezultate similare au fost obținute și pentru DNA extras din *E. coli*, care s-a dovedit a avea o masă moleculară de 2×10^9 (C a i r n s, 1962, 1963).

DNA nativ prezintă un spectru de absorbție în ultraviolet cu un maximum la 260 nm. Dacă soluțiile de DNA sînt încălzite, sau sînt supuse unei variații de *p*H mari sau se modifică constanta lor dielectrică prin adăugare în soluțiile lor apoase, de cetone, alcooli etc., sau se adaugă uree, amide, săruri ale metalelor grele etc. structura regulată a DNA este distrusă și are loc fenomenul de *denaturare*. În timpul denaturării legăturile covalente din structura DNA rămîn intacte, dar sînt distruse atît legăturile de hidrogen dintre catenele polinucleotidice cît și interacțiile de natură hidrofobă dintre bazele azotate : molecula nativă de DNA își pierde *structura sa dublu helicoidală* și trece într-o *formă dezordonată* (*random coil*). Această modificare atrage după sine schimbarea unor proprietăți fizice : creșterea absorbției la 260 nm, modificarea rotației optice, diminuarea viscozității, creșterea coeficientului de densitate ș.a.

Creșterea absorbției la 260 nm pentru soluțiile de DNA denaturat a fost definită *efect hipercrom* și el este reprodus în laborator îndeosebi sub acțiunea temperaturii. Temperatura la care absorbția preparatelor de DNA crește brusc a fost denumită *temperatură de fuziune* (*Tm*)*. În figura 5.14 sînt redate spectrele în UV ale preparatelor de DNA nativ și denaturat și

---

* Prescurtarea internațională convenită pentru temperatura de fuziune este *Tm*, deoarece derivă de la termenii anglosaxoni *„melting temperature"*

în figura 5.15 diagrama temperaturii de fuziune pentru DNA. Explicația efectului hipercrom constă în aceea că bazele azotate purinice și pirimidinice, în stare liberă, sub formă de nucleozide și nucleotide, absorb la 260 nm, dar valoarea absorbției la aceeași lungime de undă de către pre-

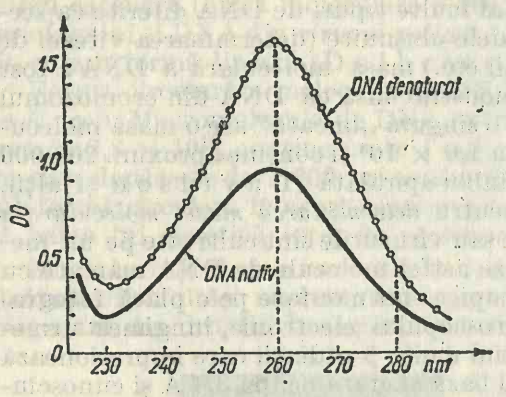


Fig. 5.14. — Creșterea coeficientului de absorbție la 260 nm pentru preparatul de DNA denaturat prin încălzire. Efectul *hipercrom* rezultă prin ruperea legăturilor de hidrogen și modificarea capacității de absorbție a DNA.

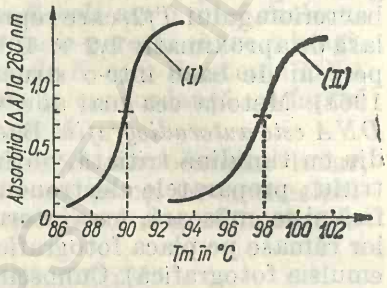


Fig. 5.15. — Temperatura de fuziune (T_m) pentru două preparate de DNA: I—DNA extras din *E. coli*; II—DNA extras din *Mycobacterium phlei*. T_m se consideră acea valoare de temperatură care este situată pe curbă la jumătatea distanței dintre punctul care indică începerea procesului de fuziune și punctul care marchează încheierea acestui proces.

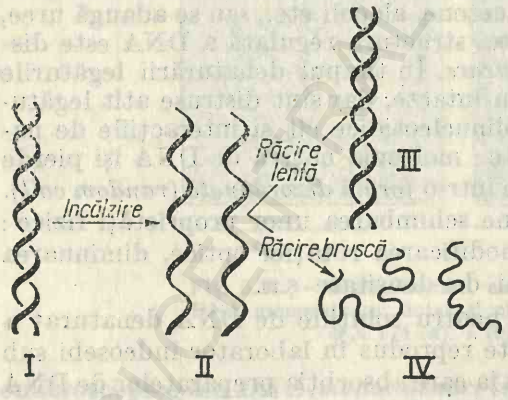


Fig. 5.16. — Denaturarea DNA nativ (I) prin încălzire duce la separarea celor două catene polinucleotidice (II). Răcirea lentă a soluțiilor care conțin cele două catene ale DNA nativ duce la refacerea sau renaturarea moleculei de DNA și la restabilirea activității biologice a DNA respectiv (III) în timp ce răcirea bruscă duce la menținerea separată în soluție a celor două catene polinucleotidice (IV).

paratele native de DNA nu reprezintă o însumare aritmetică a absorbțiilor parțiale ale bazelor azotate ci este mai mică. Acest fenomen a fost denumit *hipocrom*. După denaturarea DNA efectul hipocrom dispare și absorbția la 260 nm crește direct proporțional cu conținutul bazelor perechi A-T.

Temperatura de fuziune a DNA este funcție liniară de conținutul bazelor perechi G-C, fapt justificat de existența a trei punți de hidrogen între aceste două baze care aparțin la două catene polinucleotidice diferite, față de două punți de hidrogen care se formează între *T* și *A*. Diferite

TABELUL 5.8

Conținutul procentual al G și C în diferite preparate de DNA

Organismul sau țesutul	*G + C (%)*
Animale	
Timus de vițel	39,0
Ficat de șoarece	40,0
Splină de șoarece	44,0
Spermă de taur	41,0
Microorganisme	
Escherichia coli	50,0
Pseudomonas aeruginosa	68,0
Mycobacterium phlei	73,0
Staphylococcus aureus	33,0

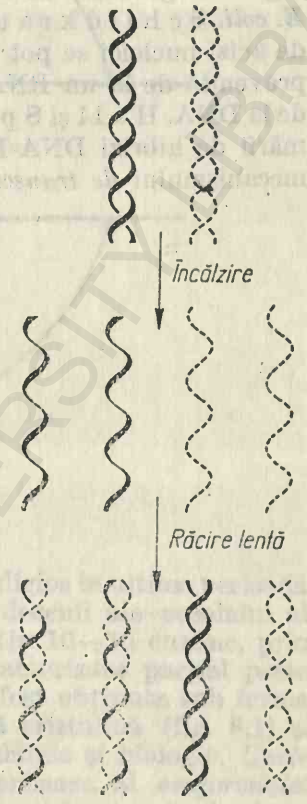


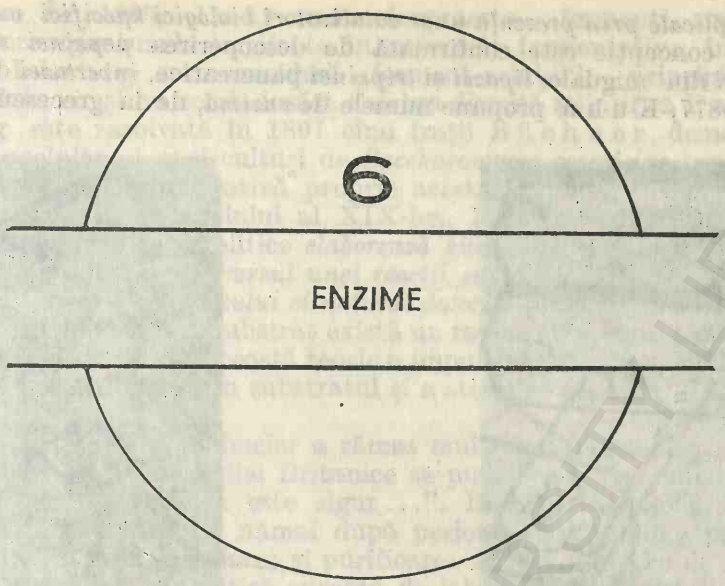
Fig. 5.17. — D o t y (1961) folosind tehnica denaturării și renaturării DNA a demonstrat că între catenele polinucleotidice aparținînd la două specii moleculare diferite de DNA, izolate din aceeași sursă biologică sau din surse biologice diferite dar apropiate filogenetic se pot forma punți de hidrogen dînd naștere astfel la molecule hibride de DNA.

specii moleculare de DNA izolate din surse diverse au *Tm* caracteristice datorită faptului că ele au un conținut procentual distinct în *G + C* (tabelul 5.8). Cu cît conținutul procentual al *G + C* este mai mare, cu atît temperatura de fusiune este mai înaltă, ceea ce demonstrează încă odată că perechea de baze G-C conferă moleculei de DNA o mai mare stabilitate.

Renaturarea DNA. Dacă preparatele de DNA sînt încălzite brusc la temperaturi mai mari decît *Tm*, cele două catene polinucleotidice se despart datorită mișcării browniene. *Răcirea lentă, progresivă* a unei astfel de soluții conduce la recombinarea specifică a celor două catene, cu refacerea dublei spirale. Acest proces de *renaturare* (fig. 5.16) duce la obținerea unui DNA cu o densitate optică normală și în CsCl prezintă aceeași densitate ca și DNA nativ (D o t y, 1961). Dacă acest procedeu se aplică soluțiilor care conțin catene polinucleotidice provenite din DNA diferite

(dar de la specii înrudite pentru ca lanțurile polinucleotidice să prezinte un grad de analogie suficient de mare) se obțin *hibrizi ai DNA* (fig. 5.17). D o t y (1961) reluînd experiențele lui M e s e l s o n și S t a h l a elucidat condițiile în care se formează hibrizii, reușind să izoleze prin ultracentrifugare în gradient de CsCl mai multe forme hibride de DNA izolat de la *E. coli*. S c h i l d k r a u t și a l ț i i (1961) au demonstrat că forme hibride de acizi nucleici se pot obține și între o catenă poliribonucleotidică, deci provenită de la un RNA și o catenă polideoxiribonucleotidică, provenită de la DNA. H a l l și S p i e g e l m a n (1964) presupun că posibilitatea formării de hibrizi DNA-RNA prezintă un interes deosebit pentru studiul mecanismului *de transcripție a informației genetice din DNA*.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY



6.1. SCURT ISTORIC

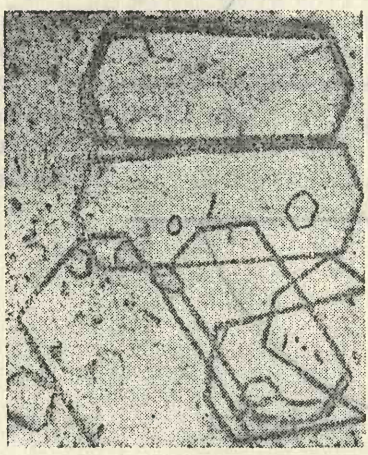
Enzimologia este o ştiinţă care s-a dezvoltat prodigios în ultima perioadă de timp, începuturile ei situîndu-se în primele decenii ale secolului al XIX-lea. Dacă în 1920 erau cunoscute aproximativ 10—15 enzime, prin observarea efectului acţiunii lor, astăzi sînt caracterizate parţial peste 2 000 de enzime, dintre care aproximativ 500 au fost obţinute sub forma unor preparate înalt purificate, unele sub formă cristalină (fig. 6.1) şi au fost caracterizate din punct de vedere fizico-chimic şi biologic. *Unele enzime au fost analizate sub raportul structurilor primare*, al *conformaţiei tridimensionale* şi au fost realizate primele *modele spaţiale macromoleculare.*

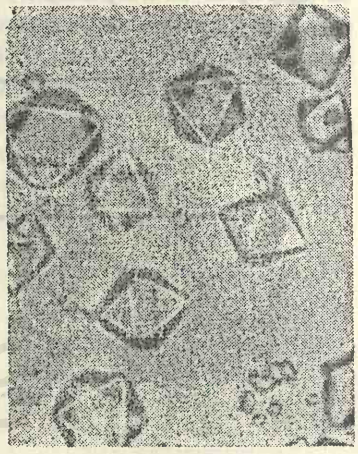
Manifestările acţiunii enzimelor (fermentaţia, respiraţia celulară, digestia) erau cunoscute de foarte mult timp, dar explicaţia mecanismului acestor procese complexe, rolul şi locul enzimelor în transformările substanţelor celulare au fost mult timp necunoscute, multe mecanisme şi procese biochimice rămînînd neclare şi astăzi.

Noţiunea de enzimă începe să se contureze de-abia în 1833 cînd P a y e n şi P e r s o z, reluînd şi dezvoltînd observaţiile anterioare ale lui K i r c h h o f f demonstrează prezenţa unui principiu activ în extractele de orz germinat, care realizează hidroliza amidonului şi pe care-l purifică prin precipitări repetate cu alcool etilic pînă la obţinerea unei pulberi albe. Aceşti autori denumesc acest preparat, care s-a dovedit a fi extrem de termolabil, *diastaza* de la grecescul *didotabis — separare.*

În perioada 1834—1837 chimistul suedez B e r z e l i u s formulează conceptul de cataliză, conform căruia *un catalizator măreşte viteza reacţiilor chimice şi rezultă la sfîrşitul lor, nemodificat-cantitativ şi calitativ.* B e r z e l i u s sugerează că diferite *fenomene biologice*, ca fermentaţia şi digestia,

pot fi explicate prin prezența unor catalizatori biologici specifici materiei vii. Această concepție este confirmată de descoperirea *pepsinei* stomacale, *emulsinei* din migdale, *lipazei* și *tripsinei* pancreatice, *invertazei* din levuri, etc. În 1877, K u h n propune numele de *enzimă*, de la grecescul *enzyme*,





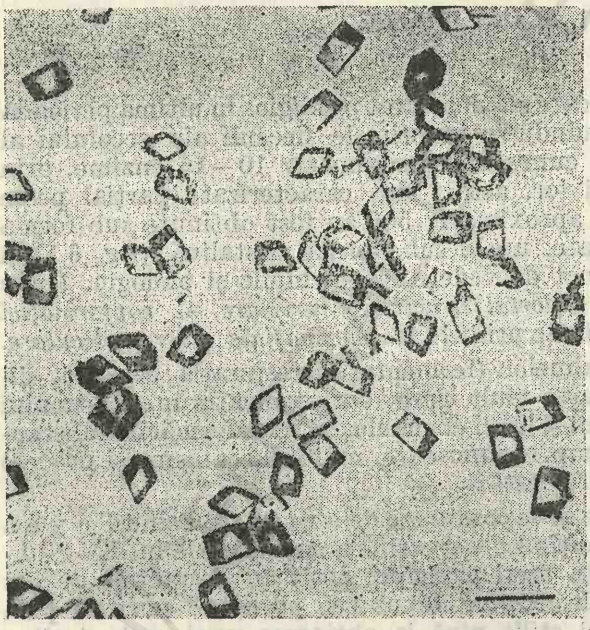


Fig. 6.1. — Enzimele se obțin în stare cristalizată din preparate enzimatice purificate, prin diferite metode. În funcție de procedeul de cristalizare (din alcool etilic absolut, din soluții apoase în prezența sulfatului de amoniu etc.) forma cristalelor poate varia. Aceeași enzimă purificată din diferite surse biologice sau din același țesut sau/și cristalizată în diferite condiții formează cristale de forme deosebite. Mai sus sînt redate cristalele de aldolază purificată din mușchiul uman și crescute în soluție tampon 0,1 *M* Tris-HCl;

a — la *p*H 7,0 și temperatura camerei; *b* — cristalele hexagonale bipiramidale ale aceleiași enzime; *c* — cristalele în formă de prismă ale aceleiași enzime crescute la temperatura de 4°C (după E a g l e s și I g b a l 1973).

care înseamnă „în drojdii", pentru toate substanțele descoperite, cu acțiune de catalizator al unei reacții biochimice. Această denumire, în acea perioadă — la mare concurență cu termenii „diastază" și „ferment" — este astăzi unanim acceptată și utilizată de biochimiști. Termenul „ferment" provine de la latinescul *ferveo* — *a fierbe* și a fost introdus datorită fierberii aparente cauzate de eliberarea de CO_2 în timpul proceselor fer-

mentative. În 1860, Pasteur denumește „fermenți organizați" însăși microorganismele implicate în procesele fermentative, în contradicție cu Liebig care consideră „ferment solubil" — principiul elaborat de celula vie și nu celula însăși. Celebra dispută științifică Pasteur-Liebig este rezolvată în 1897 cînd frații Büchner demonstrează că sucul acelular al unei culturi de *Saccharomyces cerevisiae* conservă întreaga activitate fermentativă proprie acestui microorganism.

În ultimii ani ai secolului al XIX-lea, Fischer efectuînd studii asupra unor enzime hidrolitice *elaborează binecunoscuta teorie a lacătului și cheii conform căreia în cursul unei reacții enzimatice, enzima recunoaște structura chimică a substratului ei natural datorită complementarității stereospecifice.* Între enzimă și substrat există un raport structural similar cu cel dintre lacăt și cheia lui. Această teorie a impulsionat mult studiul substanțelor înrudite structural cu substratul și a stimulat cercetările de enzimologie.

Natura chimică a enzimelor a rămas mult timp necunoscută. În ediția din 1929 a Enciclopediei Britanice se putea citi: „enzimele par a fi proteine, dar aceasta nu este sigur...". Descoperirea naturii reale a enzimelor a fost posibilă numai după perioada cînd chimia proteinelor a atins stadiul în care izolarea și purificarea acestei categorii de substanțe organice a devenit o practică curentă de laborator. Dificultățile întîlnite în separarea enzimelor au fost descrise de Vernon, în 1908 în cartea lui asupra enzimelor intracelulare: „... enzimele sînt substanțe extrem de instabile și este imposibil de-a le purifica fără a distruge o mare parte din activitatea lor ..." afirmație care astăzi ne pare puțin exagerată. În jurul anului 1920, Willstätter a reușit să purifice unele enzime utilizînd diferite metode de adsorbție selectivă. Din această perioadă începe să se contureze concepția cu privire la natura proteică a enzimelor.

În primii ani ai secolului al XX-lea, Henri și Brown pun bazele cineticii enzimatice. În 1913, Michaelis și Menten reușesc să exprime matematic particularitățile cineticii enzimatice, postulînd *formarea, în cursul reacției enzimatice, a unui complex enzimă-substrat* deosebit de reactiv, care se scindează spontan cu formarea produsului (produșilor) reacției și cu eliberarea enzimei, nemodificată din punct de vedere chimic. Astăzi, cinetica enzimatică reprezintă un subiect de studiu, deosebit de complicat și interesant, care adesea necesită calcule prin computer sau prelucrări matematice simplificatoare, fiind rezultatul unui număr impresionant de măsurători experimentale. Cunoștințele actuale despre *cinetica reacțiilor enzimatice* s-au îmbogățit treptat datorită cercetărilor lui Haldane, Chance Scatchard, Lineweaver, Burk, Theorell, Dixon, Cleland, etc. Cunoașterea legilor stării staționare, a cineticii în prezență de activatori și inhibitori, a mecanismelor liniare și ramificate ale reacțiilor enzimatice cu două substrate, a interacțiilor cooperative, a mecanismelor homotropice etc. sînt rodul cercetărilor din ultimii 10—15 ani.

O perioadă decisivă pentru elucidarea structurii chimice a enzimelor a fost izolarea lor în stare pură. Astfel, cristalizarea ureazei, în 1926, de Sumner și demonstrarea naturii ei proteice este o dată deosebit de importantă pentru biochimie. Între 1930 și 1940 Warburg, Northrop, Kunitz, Herriott și alții realizează purificarea și

cristalizarea pepsinei, tripsinei, chimotripsinei etc. — natura proteică a acestor enzime fiind demonstrată incontestabil.

Analiza structurii chimice a enzimelor a fost realizată numai după ce Moore și Hirs au dezvoltat tehnica separării cromatografice pe coloane cu rășini sintetice și după ce Sanger a pus la punct un procedeu de determinare a succesiunii aminoacizilor în macromoleculele holoproteinelor și heteroproteidelor. În 1960, Stein și Moore descriu structura completă a ribonucleazei — proteină cu o masă moleculară de 13 700, performanță care a fost reeditată în mai multe laboratoare, astăzi cunoscîndu-se secvența de aminoacizi a multor enzime. Punerea la punct a metodei de analiză a structurilor spațiale prin difracția razelor X prin cristale a permis determinarea și cunoașterea structurilor tridimensionale a proteinelor și enzimelor. După cercetările clasice ale lui Perutz asupra hemoglobinei și mioglobinei, în 1967 Phillips reușește construirea unui model tridimensional pentru molecula muramidazei (lizozim) indicînd structura centrului catalitic activ, natura legăturilor care apar în formarea complexului enzimă-substrat, propunînd și un mecanism de acțiune al enzimei. Hartley determină secvența de aminoacizi a α-chimotripsinogenului, demonstrează mecanismul de trecere de la forma de zimogen la enzima activă catalitic, iar Blow determină, prin studii de difracție a razelor X prin cristale de α-chimotripsină, structura tridimensională a acestei enzime proteolitice.

Sinteza chimică a ribonucleazei active (1969) și *identitatea ei totală cu enzima nativă* este una din marile performanțe ale enzimologiei moderne ce deschide importante posibilități de aplicabilitate teoretică și practică.

În ultimii ani s-a dezvoltat enzimologia edificiilor supramoleculare, a interacțiilor dintre diferite proteine constitutive, a mecanismelor de reglare și control a secvențelor metabolice și a concentrației diferitelor biomolecule în legătură cu nivelul subcelular de organizare a materiei vii — cercetări stimulate de teoria alosterică elaborată de Monod în 1965.

Enzimologia s-a dezvoltat rapid ca ramură de avangardă a biochimiei atît datorită interesului teoretic stîrnit de dorința de cunoaștere și aprofundare a reacțiilor biochimice care stau la baza manifestărilor vieții cît și datorită aspectelor practice: enzimele oferă un număr impresionant de posibilități de aplicare în industrie, medicină, agricultură, în viața cotidiană (menaj, curățătorii chimice, combaterea poluării, laboratoare de rutină etc.).

6.2. NOȚIUNI GENERALE

Enzimele sînt catalizatori de natură proteică care facilitează transformarea chimică a diferitelor substanțe. Substanța asupra căreia acționează enzima poartă numele de *substrat*. Compusul sau compușii chimici care rezultă în urma acțiunii enzimei poartă numele de *produs (produși) de reacție*. Unele enzime sînt asociate cu compuși cu mase moleculare mici, dializabili. Cînd acești compuși organici sînt puternic legați în structura enzimei poartă denumirea de *grupări prostetice*, cînd combinația este ușor

disociabilă poartă denumirea de *coenzime*. Acești biocatalizatori se numesc *holoenzime*, componenta proteică purtînd denumirea de *apoenzimă*. Numeroase enzime sînt alcătuite numai din resturi de aminoacizi legate între ele prin legături covalente peptidice.

Datorită naturii lor proteice, enzimele posedă toate proprietățile fizico-chimice, specifice acestor macromolecule (solubilitate, proprietăți osmotice, sarcină electrică netă, denaturare termică, reacții chimice etc.). *Masele moleculare* ale enzimelor variază în limite foarte largi. Cea mai mică enzimă, *ribonucleaza*, are o masă moleculară de 13 700. Limita superioară este mai greu de definit, edificiile moleculare mari fiind de fapt asociații a mai multor subunități proteice.

Enzimele sînt catalizatori și *respectă legile catalizei* :

— catalizatorii sînt substanțe de natură organică sau anorganică care accelerează viteza reacțiilor chimice *posibile din punct de vedere termodinamic*, determinînd o scădere a energiei de activare și conducînd la instalarea mai rapidă a stării de echilibru ;

— activitatea catalizatorilor poate fi decelată cînd sînt prezenți în concentrații extrem de mici, la concentrații în substrat relativ mari ;

— la sfîrșitul reacției chimice, catalizatorul se regăsește, din punct de vedere calitativ și cantitativ, într-o stare chimică neschimbată, putînd participa la un nou act catalitic.

Cataliza enzimatică prezintă particularități care o deosebesc de cataliza chimică. *Eficiența catalitică a enzimelor este net superioară* celei înregistrate în cazul catalizatorilor chimici, exprimîndu-se prin *numărul de turnover*, care reprezintă numărul de moli de substrat transformat, într-un minut, de un mol de enzimă. Numerele de turnover ale diferitelor enzime variază foarte mult — de la o sută la mai mult de trei milioane.

Proprietatea catalizatorilor de-a rezulta neschimbați în urma reacției ce-o catalizează este respectată cu aproximație în cazul enzimelor, care avînd structuri macromoleculare sînt extrem de instabile, fiind ușor inactivate sau denaturate la temperaturi înalte, în mediu acid sau bazic, reacționînd în condiții optime numai la anumiți parametri, numiți *parametri optimi de acțiune ai enzimei*.

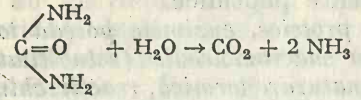
Cea mai importantă deosebire între cataliza enzimatică și cataliza chimică rezidă în *înalta specificitate de acțiune* a enzimelor concretizată în capacitatea lor de-a cataliza transformarea unui singur substrat sau a unui grup de substrate, înrudite structural. Distingem mai multe tipuri de specificitate.

Specificitatea de reacție. O dehidrogenază catalizează o reacție de dehidrogenare, o hidrolază catalizează o reacție de hidroliză etc. În cîteva cazuri, puține la număr, o enzimă catalizează două tipuri de reacții avînd proprietăți catalitice independente. Astfel, de exemplu, *malat dehidrogenaza*, izolată din *Neurospora crassa*, care catalizează reacția de dehidrogenare a acidului malic posedă și o activitate aspartat aminotransferazică.

Se admite prezența, în structura proteică a enzimei, a două zone distincte responsabile fiecare pentru un anumit tip de specificitate de reacție.

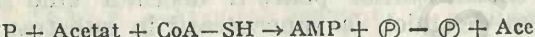
Specificitatea de substrat. Unele enzime acționează asupra unui singur substrat sau asupra unei serii de substanțe apropiate ca structură chimică ce conțin legături chimice de același fel. *Ureaza* care este o enzimă cu *spe-*

cificitate absolută de substrat, catalizează o singură reacţie, scindarea ureei cu formare de CO_2 şi NH_3, fiind total inactivă faţă de alte substanţe cu



structuri asemănătoare ureei sau chiar faţă de derivaţi ai ureei. În enzimologie se cunosc exemple în care o enzimă, catalizînd un proces bimolecular, prezintă o specificitate absolută faţă de un singur substrat sau faţă de amîndouă substratele, dar şi exemple în care una şi aceeaşi enzimă, izolată din surse biologice diferite manifestă diverse grade de specificitate.

Specificitatea absolută de grup o prezintă enzimele care acţionează asupra unui grup de substrate înrudite chimic. Astfel, de exemplu, enzima *acetil-CoA sintetaza* catalizează reacţia :

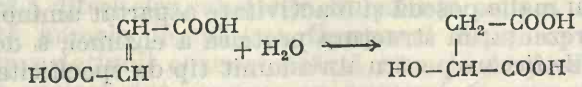


în care substratul — acetat poate fi substituit de propionat sau acrilat — substanţe transformate cu viteze similare. Lactatul, piruvatul, succinatul, malatul, salicilatul nu pot substitui acetatul în această reacţie.

Specificitatea relativă de grup o manifestă enzimele care au o acţiune specifică faţă de anumite legături chimice existente în substrat, fiind complet indiferente faţă de restul structurii chimice a moleculei pe care o scindează. Astfel, de exemplu, *fosfataza* catalizează hidroliza unui mare număr de esteri ai acidului ortofosforic, calitatea de substrat îndeplinind-o atît esterii fosforici ai alcoolilor primari şi secundari, ai unor alcooli ciclici, cît şi esterii fosforici ai glucidelor, mononucleotidelor etc.

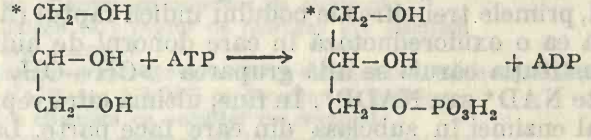
Stereospecificitatea de substrat şi de reacţie. Majoritatea biomoleculelor posedă un atom de carbon asimetric, fiind chirali şi pot exista sub forma celor doi antipozi, *D* şi *L*. O enzimă nu atacă decît unul din cei doi izomeri. De exemplu, *lactat dehidrogenaza* din ţesutul muscular catalizează oxidarea acidului *L*-lactic la acid piruvic, în timp ce enzima izolată din microorganisme atacă acidul *D*-lactic.

Cînd molecula substratului este simetrică, iar produsul reacţiei enzimatice conţine un atom de carbon asimetric, atunci enzima catalizează reacţii în cursul cărora se formează, aproape întotdeauna, un singur izomer optic. Cu alte cuvinte are loc o „*sinteză asimetrică*". Stereospecificitatea enzimelor poate fi determinată şi de alte tipuri de izomerie. Dacă substratul are o configuraţie *cis*, enzima nu atacă izomerul *trans* şi invers. De exemplu, enzima *fumaraza* care catalizează reacţia de hidroliză



a acidului fumaric la acid *L*-malic, nu catalizează şi hidroliza acidului maleic, izomerul *cis*.

Utilizîndu-se substrate marcate cu izotopi radioactivi s-a dovedit că unele enzime pot face distincţia între două grupări chimic identice. Enzima *glicerolkinaza* fosforilează asimetric glicerolul, realizînd esterificarea unei singure grupări de alcool primar, totdeauna aceeaşi:



Studiul reacţiei cu ajutorul radioizotopilor ^{13}C, ^{14}C şi ^{32}P au confirmat sinteza enzimatică asimetrică a α-glicerol fosfatului.

6.3. NOMENCLATURA ŞI CLASIFICAREA ENZIMELOR

Multe enzime au fost denumite prin *adăugarea sufixului aza la numele substratului* a cărui transformare o catalizează sau la numele tipului de reacţie care stă la baza mecanismului de acţiune al respectivei enzime. De exemplu, enzimele care catalizează *scindarea hidrolitică a proteinelor* poartă denumirea generică de *proteinaze*, enzima care catalizează *scindarea argininei* se numeşte *arginaza* etc. Pe de altă parte, de exemplu, enzima care catalizează *oxidarea (dehidrogenarea) acidului lactic* se numeşte *lactat dehidrogenază* etc. Această terminologie, de cele mai multe ori (de exemplu, *pepsina, papaina, tripsina, chimozina, ficina, catalaza)* nu dădea niciun fel de informaţii asupra naturii chimice a substratului reacţiei enzimatice sau asupra tipului de reacţie specific pe care-l catalizează enzima şi nu putea face faţă cerinţelor de noi denumiri sporite de numărul din ce în ce mai mare de enzime nou descoperite şi caracterizate sub raport fizico-chimic.

Uniunea Internaţională de Biochimie a propus în 1964 o nouă clasificare a enzimelor, pe baza căreia s-a putut stabili şi o nouă nomenclatură a acestora. Această clasificare este funcţională şi se bazează pe tipul şi mecanismul reacţiei enzimatice catalizate. După aceste criterii enzimele sînt clasificate în *şase clase*:

1. *Oxidoreductazele* (catalizează reacţii de oxidoreducere);
2. *Transferazele* (catalizează transferul diferitelor grupări care nu apar libere în timpul reacţiei);
3. *Hidrolazele* (catalizează scindarea diferitelor substrate prin adiţia apei la nivelul diferitelor legături chimice);
4. *Liazele* (catalizează adiţia sau îndepărtarea unor grupări care apar libere în timpul reacţiei);
5. *Izomerazele* (catalizează rearanjări intramoleculare) şi
6. *Ligazele* sau *sintetazele* (catalizează sinteza unei noi legături chimice) (v. Dumitru şi Iordăchescu, 1974).

Conform noului tip de nomenclatură o enzimă este definită printr-o *denumire* şi printr-un *cod*. Enzima *lactat dehidrogenaza* are codul EC 1.1.1.27

în care prima cifră a numărului de cod reprezintă una din cele șase clase de enzime. Cea de a doua și a treia cifră indică *subclase* de enzime și precizează tipul/tipurile de molecule implicate în mecanismul de reacție. În cazul dehidrogenazelor cifra a doua indică donorul de hidrogen, în timp ce cifra a treia indică acceptorul de hidrogen. În exemplul dat, al lactat dehidrogenazei, primele trei cifre ale codului indică faptul că enzima poate fi caracterizată ca o oxidoreductază în care donorul de hidrogen este un substrat în constituția căruia se află gruparea >CH—OH, iar acceptorul de hidrogen este NAD^+ sau $NADP^+$. În fine, ultima cifră reprezintă numărul de ordine al enzimei în subclasa din care face parte. Lactat dehidrogenaza este a 27-a enzimă din subclasa oxidoreductazelor care catalizează dehidrogenarea unor substrate >CH—OH, utilizînd NAD^+ sau $NADP^+$. În tabelul 6.1. prezentăm cheia clasificării și a numerotării zecimale a enzimelor*.

Oxidoreductazele catalizează reacții de tipul :

$$S_{1_{red}} \rightleftharpoons S_{1_{ox}} + n \cdot e^-$$

$$S_{2_{ox}} + n \cdot e^- \rightleftharpoons S_{2_{red}}$$

$$S_{1_{red}} + S_{2_{ox}} \rightleftharpoons S_{1_{ox}} + S_{2_{red}}$$

în care electronii sînt donați unui al doilea substrat, ca în cazul particular al reacției catalizate de *alcool : NAD oxidoreductază* (EC 1.1.1.1 ; fig. 6.2 a) :

$$\text{Alcool} + NAD^+ \rightleftharpoons \text{Aldehidă (cetonă)} + NADH + H^+$$

În cazul particular descris, denumirea sistemică ține seamă atît de natura donorului de hidrogen (alcool) și a acceptorului (NAD^+), cît și de tipul de reacție (oxidoreducere). Uniunea Internațională de Biochimie permite și recomandă utilizarea unor *denumiri de lucru* prescurtate, ca, de exemplu, alcool dehidrogenaza sau alcool oxidoreductaza.

În clasa oxidoreductazelor sînt clasificate și binecunoscutele enzime *catalaza* și *peroxidaza* (fig. 6.2 b și 6.2 c) ale căror denumiri sistemice sînt $H_2O_2 : H_2O_2$ *oxidoreductaza* (EC 1.11.1.6) și respectiv *donor* : H_2O_2 *oxidoreductaza* (EC 1.11.1.7) care catalizează reacțiile :

$$H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2$$

$$DH_2 + H_2O_2 \rightarrow D + 2\,H_2O$$

Transferazele catalizează reacții de tipul :

$$S_1 - R + S_2 \rightleftharpoons S_1 + S_2 - R$$

în care un radical R este scindat din structura unui substrat, fixîndu-se în *structura celui de-al doilea substrat.* Subclasele acestui tip de enzime indică natura acestui radical R transferat : metil, carbonil, acil, glucozil, amino etc. Astfel, de exemplu, enzima *L-aspartat : 2-oxoglutarat aminotransferaza*

* Cheia clasificării și a numerotării este reprodusă cu permisiunea Uniunii Internaționale de Biochimie (IUB), a IUPAC și a Edit. Elsevier Excerpta Medica. Narth-Holland

TABELUL 6.1

Numerotarea și clasificarea enzimelor

1. Oxidoreductaze

1.1 acționează asupra grupărilor CH—OH ca donor de hidrogen
- 1.1.1 Cu NAD^+ sau $NADP^+$ ca acceptor de hidrogen
- 1.1.2 Cu un citocrom ca acceptor de electroni
- 1.1.3 Cu oxigen ca acceptor de hidrogen sau electroni
- 1.1.99 Cu alți acceptori

1.2 acționează asupra grupărilor carbonil din aldehide sau cetone ca donor de hidrogen
- 1.2.1 Cu NAD^+ sau $NADP^+$ ca acceptor de hidrogen
- 1.2.2 Cu un citocrom ca acceptor de electroni
- 1.2.3 Cu oxigen ca acceptor de hidrogen sau electroni
- 1.2.4 Cu un compus disulfidic ca acceptor de hidrogen
- 1.2.7 Cu o fier-sulf proteină ca acceptor de hidrogen
- 1.2.99 Cu alți acceptori

1.3 acționează asupra grupărilor CH—CH ca donori de hidrogen
- 1.3.1 Cu NAD^+ sau $NADP^+$ ca acceptor de hidrogen
- 1.3.2 Cu un citocrom ca acceptor de electroni
- 1.3.3 Cu oxigenul ca acceptor de hidrogen sau electroni
- 1.3.7 Cu o fier-sulf proteină ca acceptor de hidrogen
- 1.3.99 Cu alți acceptori

1.4 acționează asupra grupărilor CH—NH_2 ca donori de hidrogen
- 1.4.1 Cu NAD^+ sau $NADP^+$ ca acceptor de hidrogen
- 1.4.2 Cu un citocrom ca acceptor de electroni
- 1.4.3 Cu oxigen ca acceptor de hidrogen sau electroni
- 1.4.4 Cu un compus disulfidic ca acceptor de hidrogen
- 1.4.99 Cu alți acceptori

1.5 acționează asupra grupărilor CH—NH ca donori de hidrogen
- 1.5.1 Cu NAD^+ sau $NADP^+$ ca acceptor de hidrogen
- 1.5.3 Cu oxigen ca acceptor de hidrogen sau electroni
- 1.5.99 Cu alți acceptori.

1.6 acționează asupra NADH sau NADPH ca donori de hidrogen
- 1.6.1 Cu NAD^+ sau $NADP^+$ ca acceptor de hidrogen
- 1.6.2 Cu un citocrom ca acceptor de ecltroni
- 1.6.4 Cu un compus disulfidic ca acceptor de hidrogen
- 1.6.5 Cu o chinonă sau cu un compus înrudit cu ea ca acceptor
- 1.6.6 Cu o grupare cu azot ca acceptor de hidrogen
- 1.6.6 Cu o grupare cu azot ca acceptor de hidrogen
- 1.6.7 Cu o fier-sulf proteină ca acceptor de hidrogen
- 1.6.99 Cu alți acceptori

1.7 acționează asupra altor compuși cu azot ca donori de hidrogen
- 1.7.2. Cu un citocrom ca acceptor de electroni
- 1.7.3 Cu oxigen ca acceptor de hidrogen sau electroni
- 1.7.7 Cu o fier-sulf proteină ca acceptor de hidrogen
- 1.7.99 Cu alți acceptori

1.8 acționează asupra unor grupări cu sulf ca donori de hidrogen
- 1.8.1 Cu NAD^+ sau $NADP^+$ ca acceptor de hidrogen
- 1.8.2 Cu un citocrom ca acceptor de electroni
- 1.8.3 Cu un oxigen ca acceptor de hidrogen sau electroni
- 1.8.4 Cu un compus disulfidic ca acceptor de hidrogen
- 1.8.5 Cu o chinonă sau cu un compus înrudit cu ea ca acceptor
- 1.8.6 Cu un compus cu azot ca acceptor de hidrogen
- 1.8.7 Cu o fier-sulf proteină ca acceptor de hidrogen
- 1.8.99 Cu alți acceptori

1.9 acționează asupra unei grupări hemice ca donor de hidrogen
- 1.9.3 Cu oxigen ca acceptor de electroni sau hidrogen
- 1.9.6 Cu un compus cu azot ca acceptor de hidrogen
- 1.9.99 Cu alți acceptori

1.10 acționează asupra difenolilor sau compușilor înrudiți cu ei ca donori de hidrogen
- 1.10.2 Cu un citocrom ca acceptor de electroni
- 1.10.3 Cu oxigenul ca acceptor de electroni și de hidrogen

1.11 acționează asupra peroxidului de hidrogen ca donor de hidrogen

1.12 acționează asupra hidrogenului ca donor
- 1.12.1 Cu NAD^+ sau $NADP^+$ ca acceptor de hidrogen
- 1.12.2 Cu un citocrom ca acceptor de electroni
- 1.12.7 Cu o fier-sulf proteină ca acceptor de hidrogen

1.13 acționează asupra unui singur donor cu incorporarea oxigenului molecular (oxigenaze)
- 1.13.11 Cu incorporarea a doi atomi de oxigen
- 1.13.11 Cu incorporarea unui atom de oxigen (monooxigenaze interne sau oxidaze interne cu funcție mixtă)
- 1.13.99 Diverse (necesită caracterizări ulterioare)

1.14 acționează asupra unei perechi de donori cu incorporarea oxigenului molecular
- 1.14.11 Cu 2-oxoglutarat ca un donor și incorporarea fiecărui atom în fiecare donor
- 1.14.12 Cu NADH sau NADPH ca un donor și incorporarea a doi atomi de oxigen într-un singur donor
- 1.14.13 Cu NADH sau NADPH ca un donor și incorporarea unui singur atom de oxigen
- 1.14.14 Cu flavină sau flavoproteină redusă ca un donor și incorporarea unui atom de oxigen
- 1.14.15 Cu o fier-sulf proteină redusă ca donor și incorporarea unui atom de oxigen
- 1.14.16 Cu o pteridină redusă ca un donor și incorporarea unui atom de oxigen
- 1.14.17 Cu ascorbat ca un donor și incorporarea unui atom de oxigen
- 1.14.18 Cu un alt compus ca un donor și incorporarea unui atom de oxigen
- 1.14.99 Diverse (necesită caracterizări ulterioare)

1.15 acționează asupra radicalilor superoxid ca acceptor

1.16 oxidează ioni metalici
- 1.16.3 Cu oxigen ca acceptor

1.17 acționează asupra grupărilor $—CH_2—$
- 1.17.1 Cu NAD^+ sau $NADP^+$ ca acceptor
- 1.17.4 Cu un compus disulfidic ca acceptor

2. Transferaze

2.1 transferă grupări cu un atom de carbon
- 2.1.1 Metiltransferaze
- 2.1.2 Hidroximetil-, formiltransferaze și transferaze a unor compuși înrudiți
- 2.1.3 Carboxil- și carbamoiltransferaze
- 2.1.4 Amidinotransferaze

2.2 transferă resturi de aldehide sau cetone

2.3 aciltransferaze
- 2.3.1 Aciltransferaze
- 2.3.2 Aminoaciltransferaze

2.4 glicoziltransferaze
- 2.4.1 Hexoziltransferaze
- 2.4.2 Pentoziltransferaze
- 2.4.99 Transferaze pentru alte grupări glicozil

2.5 transferă grupări alchil (altele decît metil) și grupări aril

2.6 transferă grupări cu azot
- 2.6.1 Aminotransferaze
- 2.6.3 Oximinotransferaze

2.7 transferă grupări ce conțin fosfor
- 2.7.1 Fosfotransferaze cu o grupare alcool ca acceptor
- 2.7.2 Fosfotransferaze cu o grupare carboxil ca acceptor
- 2.7.3 Fosfotransferaze cu o grupare cu azot ca acceptor
- 2.7.4 Fosfotransferaze cu o fosfo-grupare ca acceptor
- 2.7.5 Fosfotransferaze cu regenerarea donorilor (catalizează transferuri intramoleculare)
- 2.7.6 Difosfotransferaze
- 2.7.7 Nucleotidiltransferaze
- 2.7.8 Transferaze pentru alte grupări cu fosfor, substituite
- 2.7.9 Fosfotransferaze cu o pereche de acceptori

2.8 transferă grupări ce conţin sulf
- 2.8.1 Sulftransferaze
- 2.8.2 Sulfotransferaze
- 2.8.3 CoA transferaze

3. Hidrolaze

3.1 acţionează asupra legăturilor esterice
- 3.1.1 Ester carboxilic hidrolaze
- 3.1.2 Tiolester hidrolaze
- 3.1.3 Fosfomonoester hidrolaze
- 3.1.4 Fosfodiester hidrolaze
- 3.1.5 Monoester trifosforic hidrolaze
- 3.1.6 Ester sulfuric hidrolaze
- 3.1.7 Monoester difosforic hidrolaze

3.2 acţionează asupra compuşilor glicozil
- 3.2.1 Hidrolizează compuşi O-glicozil
- 3.2.2 Hidrolizează compuşi N-glicozil
- 3.2.3 Hidrolizează compuşi S-glicozil

3.3 acţionează asupra legăturilor eterice
- 3.3.1 Tioeter hidrolaze
- 3.3.2 Eter hidrolaze

3.4 acţionează asupra legăturilor peptidice
- 3.4.11 α-Aminoacilpeptid hidrolaze
- 3.4.12 Peptidilaminoacid sau acilaminoacid hidrolaze
- 3.4.13 Dipeptid hidrolaze
- 3.4.14 Dipeptidilpeptid hidrolaze
- 3.4.15 Peptidildipeptid hidrolaze
- 3.4.21 Serin proteinaze
- 3.4.22 SH-proteinaze
- 3.4.23 Acid proteinaze
- 3.4.24 Metaloproteinaze
- 3.4.99 Proteinaze cu mecanism catalitic necunoscut

3.5 acţionează asupra unor legături C—N, altele decît legăturile peptidice
- 3.5.1 În amide lineare
- 3.5.2 În amide ciclice
- 3.5.3 În amidine lineare
- 3.5.4 În amidine ciclice
- 3.5.5 În nitrili
- 3.5.99 În alţi compuşi

3.6 acţionează asupra anhidridelor acide
- 3.6.1 În anhidride conţinînd grupare fosforil
- 3.6.2 În anhidride conţinînd grupare sulfonil

3.7 acţionează asupra legăturilor C—C
- 3.7.1 În substanţe cetonice

3.8 acţionează asupra halogen legăturilor
- 3.8.1 În compuşi C-halogen
- 3.8.2 În compuşi P-halogen

3.9 acţionează asupra legăturilor P—N

3.10 acţionează asupra legăturilor S—N

3.11 acţionează asupra legăturilor C—P

4. Liaze

4.1 Carbon — carbon liaze
- 4.1.1 Carboxi-liaze
- 4.1.2 Aldehid-liaze
- 4.1.3 Oxoacid-liaze
- 4.1.99 Alte C—C liaze

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

TABELUL 6.1. (continuare)

4.2 Carbon — oxigen liaze
4.2.1 Hidro-liaze
4.2.2 Acţionează asupra polizaharidelor
4.2.99 Alte C—O liaze
4.3 Carbon — azot liaze
4.3.1 Amoniac-liaze
4.3.2 Amidin-liaze
4.4 Carbon — sulf liaze
4.5 Carbon — halogen liaze
4.6 Fosfor — oxigen liaze
4.99 Alte liaze

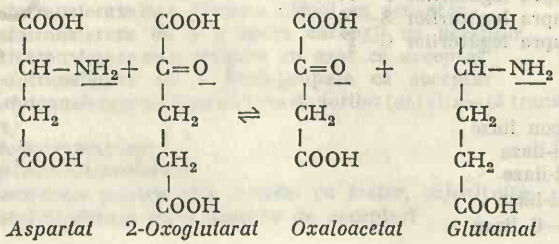
5. Izomeraze

5.1 Racemaze şi epimeraze
5.1.1 Acţionează asupra aminoacizilor şi derivaţilor lor
5.1.2 Acţionează asupra hidroxiacizilor şi derivaţilor lor
5.1.3 Acţionează asupra hidraţilor de carbon şi derivaţilor lor
5.1.99 Acţionează asupra altor compuşi
5.2 Cis-trans izomeraze
5.3 Oxidoreductaze intramoleculare
5.3.1 Intertransformă aldehidele şi cetonele
5.3.2 Intertransformă grupările ceto-şi enol
5.3.3 Catalitează transpoziţii la legături C=C
5.3.4 Catalizează transpoziţii la legături S—S
5.3.99 Alte oxidoreductaze intramoleculare
5.4 Transferaze intramoleculare
5.4.1 Transferă grupări acil
5.4.2 Transferă grupări fosforil
5.4.3 Transferă grupări amino
5.4.99 Transferă alte grupări
5.5 Liaze intramoleculare
5.99 Alte izomeraze

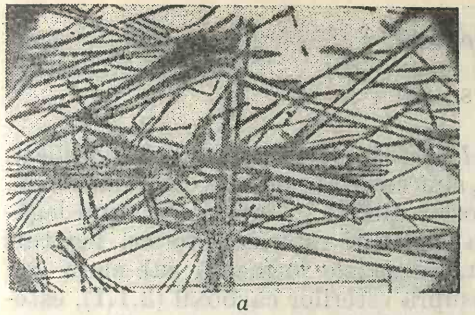
6. Ligaze (Sintetaze)

6.1 formează legături carbon — oxigen
6.1.1 Ligaze formînd aminoacil-tRNA şi alţi compuşi înrudiţi
6.2 formează legături carbon — sulf
6.2.1 Acid-tiol ligaze
6.3 formează legături carbon — azot
6.3.1 Acid-amoniac ligaze (amid sintetaze)
6.3.2 Acid-aminoacid ligaze (peptid sintetaze)
6.3.3 Ciclo-ligaze
6.3.4 Alte C—N ligaze
6.3.5 C—N ligaze cu glutamină ca amido-N-donor
6.4 formează legături carbon — carbon
6.5 formează legături esterice fosfat

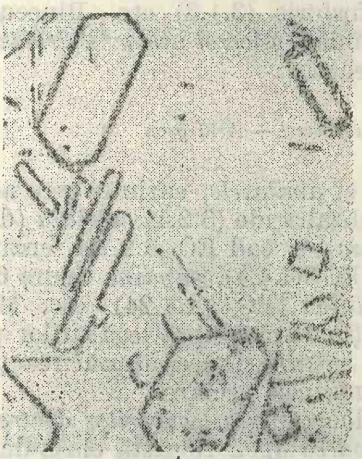
(EC 2.6.1.1) cu denumirea veche *glutamat oxaloacetat transaminaza* (GOT) catalizează reacţia :



BCU IASI - FILIALA UNIVERSITATEA LIBRARY



a



b

c

d

Fig. 6.2. — Forma cristalelor unor enzime; izolate din diferite surse biologice:

a — alcool: NAD-oxidoreductaza din ficatul de cabaline; *b* — catalaza purificată din ficatul de ovine (mărire × 250); *c* — peroxidaza extrasă din germenii de grîu (mărire × 250); *d* — papaina (microfotografie).

în care are loc o reacţie de transfer a unei grupări cu azot (2.6) şi anume a unei grupări amino (2.6.1). În cadrul denumirii sistemice a enzimei se găsesc informaţii asupra naturii chimice a celor două substrate şi asupra grupării care este transferată în cursul reacţiei. Este permisă şi denumirea de lucru, prescurtată, *L-aspartat aminotransferaza.*

BCU CLUJ UNIVERSITY LIBRARY

Hidrolazele catalizează reacţii de tipul :

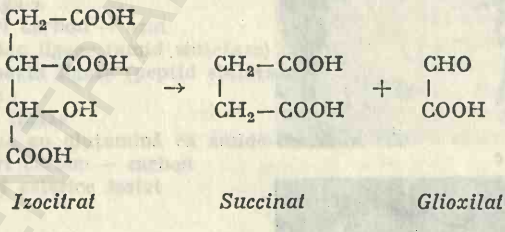
$$S_1-X + H_2O \rightleftharpoons S_1-OH + X-H$$

care sînt teoretic reversibile, *echilibrul lor fiind deplasat în sensul hidrolizei.* De regulă, reacţiile inverse, de sinteză, sînt realizate pe alte căi metabolice. Subdiviziunile clasei hidrolazelor au fost realizate în funcţie de tipul legăturii asupra căreia acţionează enzima (legături esterice, eterice, legături C—N, C—C, C—S etc.). De exemplu, esterazele formează sub-clasa 3.1 şi înglobează enzime care acţionează asupra esterilor carboxil (3.1.1), esterilor tiolici (3.1.2), esterilor acidului ortofosforic (3.1.3) etc. Binecunoscuta enzimă *lipaza* are denumirea sistemică *glicerol : ester hidrolaza* şi codul EC 3.1.1.3, deoarece catalizează reacţia :

Triacilglicerol + H_2O → *Diacilglicerol* + *Acid gras*

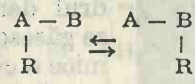
În această clasă de enzime sînt cuprinse şi *amilazele*, enzime care acţionează asupra legăturilor glicozidice din polizaharide (3.2.1) *celulaza* (denumire sistemică *β-1,4-glucan glucanohidrolaza)* şi cod EC 3.2.1.4, enzimele proteolitice *pepsina* (EC 3.4.4.1), *tripsina* (EC 3.4.4.4), *papaina* figura 6.2 d (EC 3.4.4.10), *ficina* (EC 3.4.4.12), *bromelaina* (EC 3.4.4.24) etc. Majoritatea enzimelor din subclasa 3.4 care acţionează asupra legăturilor peptidice nu au o denumire sistemică deoarece natura şi mecanismul reacţiilor enzimatice catalizate de aceste enzime sînt încă neclare.

Liazele catalizează reacţii în care are loc *ruperea legăturilor dintre doi atomi* (C—C ; C—heteroatom) *fără participarea apei.* Această clasă de enzime este subîmpărţită în subclasele : C—C liaze (4.1), C—O liaze (4.2), C—N liaze (4.3), C—S liaze (4.4), C—halogen liaze (4.5) etc. Din această categorie de enzime fac parte decarboxilazele (4.1.1), aldolazele (4.1.2), binecunoscuta enzimă carbonic anhidraza (EC 4.2.1.1) etc. De exemplu, enzima izocitrat glioxilat liaza (EC 4.1.3.1) catalizează reacţia :



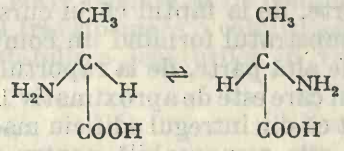
în care, după scindarea legăturii C—C are loc o rearanjare care conduce la oxidarea alcoolului secundar la aldehidă.

Izomerazele catalizează reacţii în care au loc *rearanjări intramoleculare* :



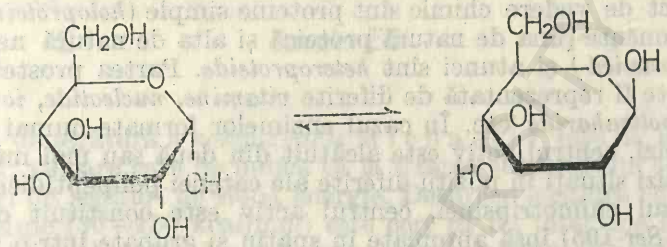
Din această clasă fac parte *racemazele* şi *epimerazele* (EC 5.1), izomerazele *cis-trans* (EC 5.2), oxidoreductazele intramoleculare (EC 5.3) şi

transferazele intramoleculare (EC 5.4). Astfel, de exemplu, enzima alanin-racemaza (EC 5.1.1.1) catalizează reacţia fiind înalt specifică pentru *L*



L-alanină *D-alanină*

şi *D*-alanină, aldoză 1-epimeraza (EC 5.1.3.3) catalizează reacţia :



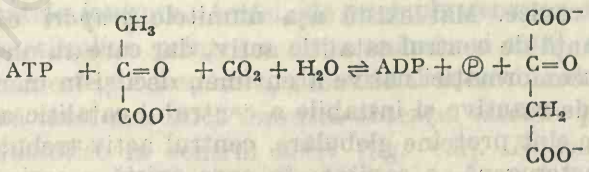
α-D-glucopiranoză *β-D-glucopiranoză*

Ligazele sau **sintetazele (sintazele)** *catalizează reacţii de sinteză* utilizînd energia eliberată în urma scindării hidrolitice a moleculei de ATP

$$A + B \rightarrow A - B$$

$$X - Y + H_2O \rightarrow XH + Y - OH$$

În acest fel se pot constitui noi legături C—O (EC 6.1), C—S (EC 6.2), C—N (EC 6.3), C—C (EC 6.4). În această clasă sînt incluse enzimele aminoacil-tRNA sintetaza implicate în complexul proces de biosinteză a proteinelor, acetil-CoA sintetaza (EC 6.2.1.1) implicată în biosinteza acetilcoenzimei *A*, succinil-CoA sintetaza (EC 6.2.1.4) care utilizează pentru sinteza succinil-CoA energia înglobată în molecula macroergică a GTP, etc. De exemplu, enzima piruvat carboxilaza, cu denumirea sistemică piruvat : CO_2 ligaza (ADP) şi cu codul EC 6.4.1.1 catalizează reacţia reversibilă :



Piruvat *Oxaloacetat*

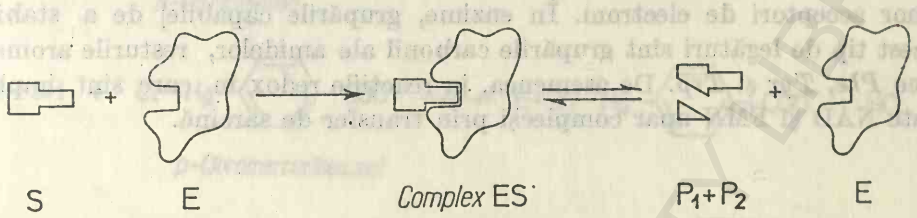
6.4. CENTRUL ACTIV AL ENZIMEI

Pornind, pe de-o parte, de la faptul că în cursul reacţiilor enzimatice, enzima se combină cu substratul formînd un complex deosebit de reactiv enzimă-substrat şi, pe de altă parte, de la raportul procentual dintre masa moleculară a substratului care este de aproximativ 1 % din masa moleculară a enzimei devine evident că din întregul edificiu macromolecular al enzimei numai o mică porţiune este responsabilă pentru recunoaşterea structurii stereochimice a substratului, pentru legarea lui şi pentru iniţierea şi definitivarea actului catalitic propriu-zis. Această regiune, geometric discretă, din molecula enzimei poartă numele de *centru activ* sau *situs catalitic activ*. Enzimele pot fi alcătuite fie numai din lanţuri polipeptidice de aminoacizi şi din punct de vedere chimic sînt proteine simple (*holoproteine*), fie din două componente (una de natură proteică şi alta de natură neproteică — *grupare prostetică*) şi atunci sînt *heteroproteide*. Partea prostetică a unei enzime poate fi reprezentată de diferite *vitamine*, *nucleotide*, *ioni metalici*, *oligo-* sau *polizaharide* etc. În cazul enzimelor formate numai din resturi de aminoacizi, centrul activ este alcătuit din două sau mai multe resturi de aminoacizi situaţi în poziţii diferite ale catenei polipeptidice (de exemplu, în cazul chimotripsinei, centrul activ este constituit din *His*-57, *Asp*-102 şi *Ser*-195) însă apropiate în spaţiu şi grupate într-o zonă cu un diametru de aproximativ 20 Å, ca urmare a plierii macromoleculei proteice. Denaturarea enzimelor care implică modificarea conformaţiei spaţiale conduce la distrugerea totală sau parţială a structurii centrului activ, deci la pierderea totală sau parţială a activităţii catalitice. În cazul enzimelor cu structură heteroproteidică (metaloenzime, NAD^+- şi $NADP^+$-enzime, FAD-enzime, piridoxal fosfat-enzime etc.) de regulă partea prostetică face parte din centrul activ, participînd efectiv la actul catalitic. Rolul centrului activ este de a „recunoaşte" substratul (substanţa asupra căreia acţionează enzima), de a-l lega cu formarea unui complex enzimă-substrat, deosebit de activ şi de a realiza actul catalitic propriu-zis în urma căruia se formează produsul (produşii) reacţiei enzimatice şi se eliberează catalizatorul într-o stare chimic neschimbată. Centrul catalitic poate „recunoaşte" substratul, datorită faptului că cele două entităţi prezintă stereochimii complementare care permit stabilirea de interacţii fizice şi chimice.

În cadrul interacţiei dintre enzimă (E) şi substrat (S), în structura macromoleculară a enzimei se disting nişte *grupări de fixare*, care leagă substratul, participînd într-un fel sau altul la actul catalitic. În imediata vecinătate, pot exista *grupările auxiliare*, care deşi nu realizează un contact direct cu substratul pot influenţa mecanismul de reacţie prin diferite interacţii electronice. Mai există aşa numitele *grupări conformaţionale*, situate la distanţă de centrul catalitic activ, dar care au un rol important în menţinerea conformaţiei native a enzimei, deci şi în menţinerea structurii deosebit de reactive şi instabile a centrului catalitic activ. În cazul enzimelor, care sînt proteine globulare, centrul activ trebuie imaginat ca o zonă microheterogenă, o cavitate în care există o serie de resturi de aminoacizi hidrofobi — care realizează un micromediu neapos necesar

izolării substratului și actului catalitic, precum și o serie de aminoacizi hidrofili care prin grupările lor polare iau parte la mecanismul de reacție.

Geometria centrului activ trebuie să fie complementară cu cea a substratului natural a cărui transformare o catalizează, să-i permită „pătrunderea" în cavitate și stabilirea legăturilor în vederea formării complexului enzimă-substrat.



Energia de legătură a *complexului* Michaelis este de aproximativ 10 kcal/mol, valoare care ne indică că la fixarea substratului concură mai multe tipuri de legături de slabă energie. Deoarece legătura covalentă are o mare energie (30—150 kcal/mol) este cert că nu intervine în formarea complexului inițial, apărînd însă în cursul mecanismului de cataliză. Astăzi, se cunosc cinci tipuri de legături care apar în formarea complexului Michaelis deci în legarea substratului la centrul activ al enzimei.

Legătura coordinativă, realizată prin punerea în comun a electronilor neparticipanți ai unui donor (azot, oxigen), posedă caracterul și energia legăturilor covalente și apare numai în cazul catalizei enzimatice în care sînt implicate metalele (metaloenzime sau enzime activate de metale în care efectorul participă la formarea complexului enzimă-substrat).

Legătura de hidrogen se realizează prin atragerea electrostatică a hidrogenului de către electronii neparticipanți ai fluorului, oxigenului sau azotului și apare atît între grupările amidice ale catenei polipeptidice, contribuind la formarea α-helixului, cît și între grupările polare ale resturilor de aminoacizi hidrofili. Există multe exemple în care legăturile de hidrogen participă la fixarea substratului de centrul activ al enzimei. Astfel, legarea substratului polizaharidic la centrul activ al muramidazei are loc prin zece legături de hidrogen, a căror energie individuală este probabil de numai 1—1,5 kcal/mol.

Deoarece majoritatea grupărilor polare ionizează la *p*H fiziologic *(Lys, Arg, Asp, Glu)*, acestea pot dezvolta *forțe de atracție electrostatică* față de substratele ionizate. Astfel, de exemplu, enzima acetilcolinesteraza fixează acetilcolina printr-un situs anionic și unul esterazic. Izoamilacetatul, care este, de asemenea, substrat al acestei enzime, este hidrolizat cu o viteză mult mai mică datorită absenței sarcinii pozitive, sediul atracției electrostatice la centrul activ (fig. 6.3). *Interacțiile hidrofobe* sau *forțele* van der Waals sînt realizate de catenele laterale alifatice sau aromatice ale resturilor de aminoacizi și apar în special la substra-

tele de natură lipidică sau steroidică. Ultimele forţe de legare între centrul activ şi substrat îşi au originea în faptul că atunci cînd o moleculă este bogată în electroni şi are în imediata apropiere o altă moleculă săracă în electroni are loc un *transfer de sarcină*, cînd se formează un ansamblu polarizat şi o forţă de legătură care uneşte cele două molecule. De obicei electronii din dublele legături sau din inelele aromatice sînt transferaţi unor acceptori de electroni. În enzime, grupările capabile de a stabili acest tip de legături sînt grupările carbonil ale amidelor, resturile aromatice *Phe*, *Tyr* şi *Trp*. De asemenea, în reacţiile redox în care sînt implicate NAD şi FMN apar complecşi prin transfer de sarcină.

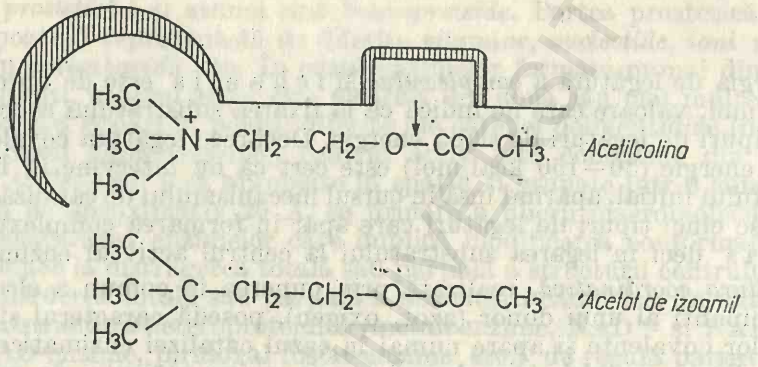


Fig. 6.3. — Acetilcolina şi acetatul de izoamil — două substrate ale acetilcolinesterazei, hidrolizate cu viteze diferite datorită diferenţei de atracţie electrostatică la centrul activ al enzimei.

Elucidarea structurii centrului activ al enzimelor se poate realiza fie prin studii cu *reactivi de grup*, fie prin studii de *marcare covalentă cu substratul sau cu analogi de substrat*. O serie de reactivi reacţionează ireversibil cu grupări specifice din structura enzimei. Practic, se lasă enzima să reacţioneze cu o anumită cantitate de reactiv şi se determină activitatea catalitică reziduală. Dacă această activitate a scăzut considerabil se poate presupune că acea grupare este implicată, într-o măsură mai mare sau mai mică, în actul catalitic.

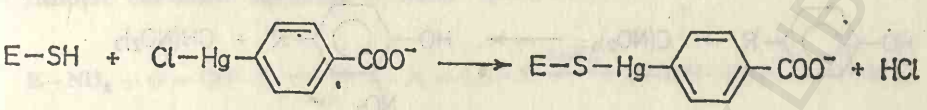
Pentru grupările tiol ale resturilor de cisteină inserate în structura enzimelor sînt utilizaţi următorii reactivi de grup :

$$E-SH + I-CH_2-COOH(I-CH_2-CO-NH_2) \rightarrow$$

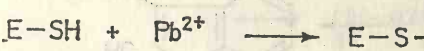
Acid iodacetic (iodacetamidă)

$$\rightarrow E-S-CH_2-COOH(E-S-CH_2-CO-NH_2)+HI$$

N-Etilmaleimidă

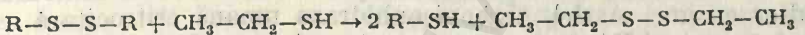


p-Cloromercuribenzoat

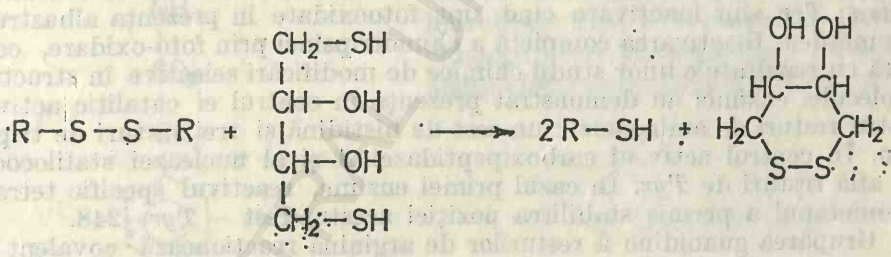


Metale grele

iar pentru punţile disulfurice :



Mercaptoetanol

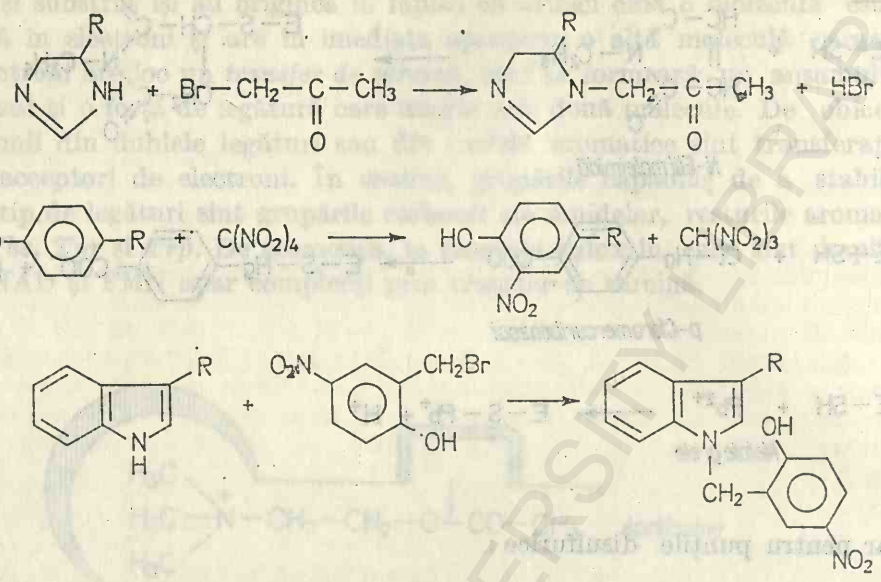


Ditiofreitol

Deşi multe enzime au grupări SH, nu toate se găsesc situate în centrul activ. Astfel, din cele zece grupări SH ale aldolazei, niciuna nu se găseşte în centrul activ al acestei enzime şi reacţia cu reactivi de grup nu conduce la diminuarea activităţii enzimatice. In structura centrului activ al proteinazei stafilococice se găseşte o grupare tiol de 100 ori mai reactivă decît glutationul în reacţiile de alchilare cu acidul iodacetic şi iodacetamida.

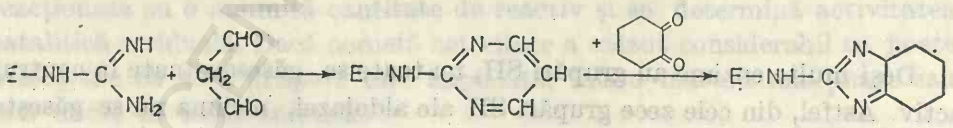
Reactivii de grup, cel mai mult utilizaţi în studiul centrului activ pentru identificarea resturilor de histidină, tirozină şi triptofan sînt respectiv

nromacetona, tetranitrometanul şi respectiv bromura de 2-hidroxi-5-nitrobenzil:

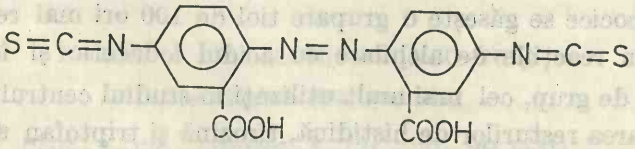


Nucleul imidazolic al histidinei face parte din structura centrului activ al multor enzime. Astfel, carbonicanhidraza umană eritrocitară conţine în total 11 resturi *His* dintre care numai unul singur face parte din centrul activ. Prin reacţie cu bromacetona activitatea enzimatică scade cu 95%. Enzimele care prezintă în centrul activ unul sau mai multe resturi de *His* şi *Trp* sînt inactivate cînd sînt fotooxidate în prezenţa albastrului de metilen. Inactivarea completă a chimotripsinei prin foto-oxidare, corelată cu rezultatele unor studii chimice de modificări selective în structura moleculei enzimei au demonstrat prezenţa în centrul ei catalitic activ a patru resturi de aminoacizi: un rest de histidină şi trei resturi de triptofan. În centrul activ al carboxipeptidazei *A* şi al nucleazei stafilococice se află resturi de *Tyr*. În cazul primei enzime, reactivul specific tetranitrometanul a permis stabilirea poziţiei acestui rest — *Tyr*—248.

Gruparea guanidino a resturilor de arginină reacţionează covalent cu aldehida malonică şi cu *o*-ciclohexandiona, după reacţiile:



În ultimul timp sînt utilizaţi reactivii covalenţi bifuncţionali de tipul 2,2′-dicarboxi-4,4′-izotiocianatazobenzenului,



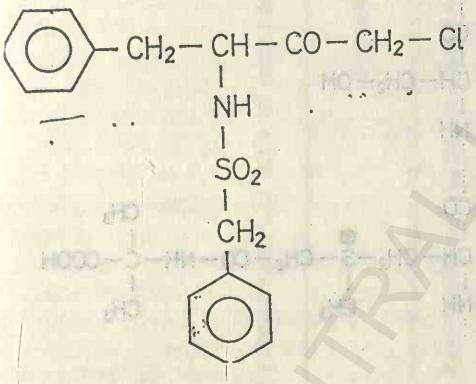
care reacționează cu cele două grupări amino ale lizinei, cu condiția ca distanța dintre ele să fie de 20 Å.

Reactivul ideal, pentru identificarea centrului activ este însăși substratul nativ, dar legătura lui cu centrul activ este atît de labilă încît nu permite, după hidroliză, identificarea grupărilor chimice care au asigurat fixarea. Pentru acest motiv se procedează la mărirea stabilității acesteia prin diferite tratamente chimice. Astfel, de exemplu, enzimele care au în centrul lor catalitic activ și un rest de *Lys* reacționează cu substrate cu funcții carbonil formînd o bază Schiff:

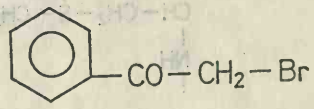
$$E-NH_2 + O=CH-X \xrightarrow[H_2O]{} E-N=CH-X \xrightarrow{NaBH_4} E-NH-CH_2-X \xrightarrow{H^+}$$

$$\longrightarrow \begin{array}{l} COOH \\ | \\ CH-(CH_2)_4-NH-CH_2-X \\ | \\ NH_2 \end{array}$$

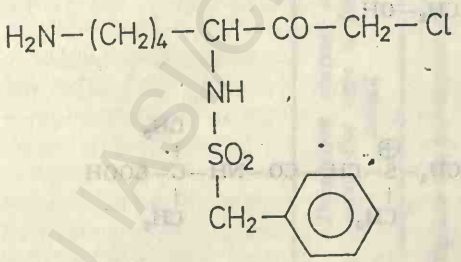
care tratată cu $NaBH_4$ reduce legătura iminică la amină secundară și formează un compus stabil și identificabil după hidroliză. Acest tip de legătură apare în cazul aldolazei, fosforilazei *b* etc.



Analogii de substrat a căror structură chimică este „recunoscută" de centrul activ al enzimei se pot lega la aceasta formînd complecși stabili care pot fi separați după hidroliza totală a enzimei. În cazul chimotripsinei, toluen sulfonil-*L*-fenilalanil-clorometilcetona (TPCK) este

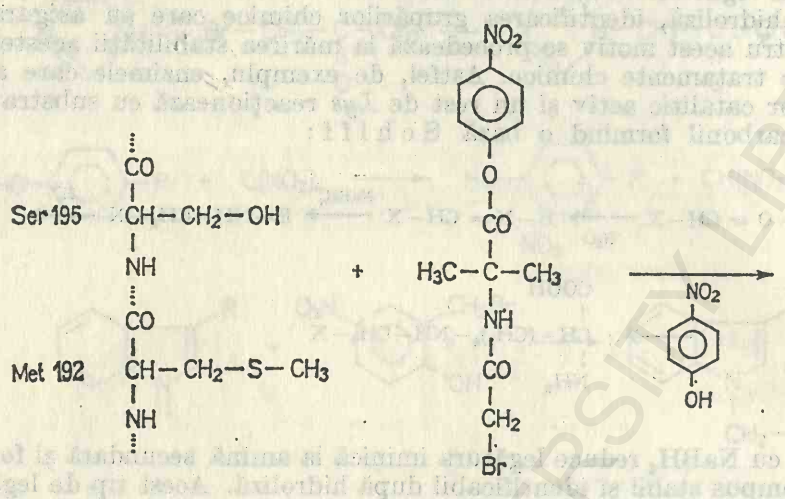


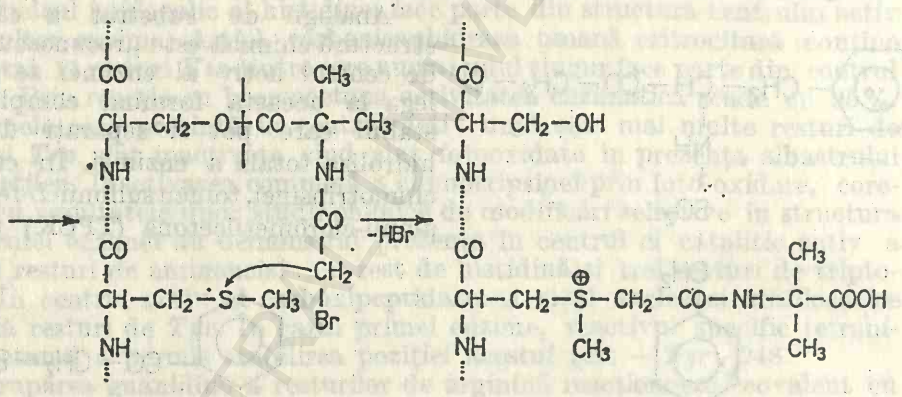
un analog de substrat care se leagă covalent la restul de *His* din centrul activ al enzimei și bromura de fenacil se leagă la restul de *Met*.

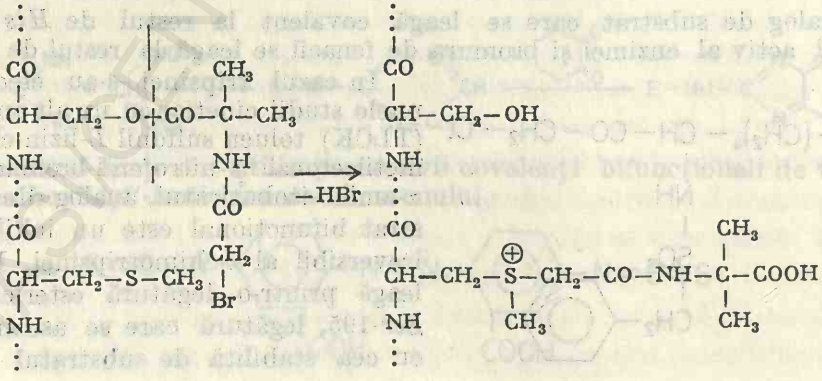


In cazul tripsinei s-au efectuat unele studii cinetice cu un alt analog (TLCK) toluen sulfonil *L*-lizin-clorometilcetona. *p*-nitrofenil-bromacetil-α-amino-izobutiratul, analog de substrat bifuncțional este un inhibitor ireversibil al α-chimotripsinei. El se leagă printr-o legătură esterică la *Ser*-195, legătură care se aseamănă cu cea stabilită de substratul nor-

mal (c peptidă). Datorită caracterului labil al legăturii noi formate are loc o orientare în spațiu a moleculei, soldată cu interacția dintre restul *Met*-192 și analogul de substrat cu formarea unui derivat stabil.







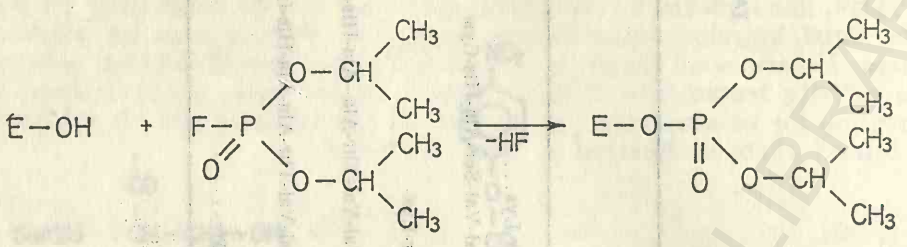
TABELUL 6.2.

Configurația centrului activ al unor proteinaze care sînt serin-enzime

Denumirea enzimei și sursa din care a fost izolată	*Secvența aminoacizilor în centrul activ*
Tripsina din pancreasul de porc	...Asn-Ser-Gly-Ser-His-Phe-Cys-Gly-Cly-Ser-Leu Ala-Ala-His-Cys-Tyr-Lys...
Tripsina din pancreasul de bou	...Asx-Ser-Gly-Tyr-His-Phe-Cys-Gly-Gly-Ser-Leu-Ile-Asn-Ser-Gln-Trp-Val-Val-Ser-Ala-His-Cys-
Tripsina din pancreasul de curcan	...Asx-Ser-Gly-Tyr-His-Phe-Cys-Gly-Gly-Ser-Leu Ala-Ala-His-Cys-Tyr-Lys-
Chimotripsină *A* din pancreasul de bou	...Lys-Thr-Gly-Phe-His-Phe-Cys-Gly-Gly-Ser-Leu-Ile-Asn-Glu-Asn-Trp-Val-Val-Thr-Ala--Ala-His-Cys-
Chimotripsină *B* din pancreasul de bou	...Ser-Thr-Gly-Phe-His-Phe-Cys-Gly-Gly-Ser-Leu-Ile-Ser-Glu-Asn-Trp-Val-Val-Thr-Ala-Ala-His-Cys-
Elastază din pancreasul de bou	.....-Cys-Gly-Gly-Thr-Leu Thr-Ala-Ala-His-Cys-.....

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

O serie de enzime hidrolitice au în centrul lor activ un rest de serină (Tabelul 6.2) care poate fi localizat prin reacţia cu diizopropilfluorofosfatul :



Pentru a evita legarea nespecifică a diizopropilfluorofosfatului la alte grupări decît cele situate în centrul catalitic se procedează la mascarea iniţială a acestui situs cu un inhibitor competitiv, urmată de tratamentul cu diizopropilfluorofosfat care blochează toate grupările reacţionabile. Excesul de diizopropilfluorofosfat şi de inhibitor competitiv este îndepărtat prin dializă, cînd capacitatea catalitică reapare. În ultimă instanţă preparatul enzimatic este tratat cu diizopropilfluorofosfat marcat cu ^{32}P, care se leagă numai la centrul catalitic. Hidroliza şi metodele cromatografice aplicate adecvat permit localizarea restului de serină blocat cu reactiv specific, marcat cu ^{32}P.

6.5. STRUCTURA ENZIMELOR

Enzimele fiind *substanţe cu structură proteică* prezintă toate structurile specifice macromoleculelor proteice (v. cap. 3). Structura primară a enzimelor a fost elucidată în multe cazuri, cercetătorii utilizînd metodele curente de studiu ale chimiei proteinelor. Structura secundară se caracterizează prin legăturile de hidrogen care se stabilesc în cadrul aceleiaşi catene polipeptidice sau între două catene polipeptidice diferite, enzimele avînd diferite conţinuturi procentuale de α-helix, β-structură pliată şi structură dezordonată („random coil"). Între structura primară şi structura secundară a enzimelor există o strînsă corelaţie. Astfel, resturile aminoacizilor care au o anumită preferinţă pentru un anumit tip de structură secundară sînt *Arg*, *Gly* şi *Tyr* — pentru „random coil", *Ala* şi *Val* pentru α-helix şi *Leu* cu *Phe* pentru β-structură.

Enzima proteolitică, carboxipeptidaza *A*, are o structură primară în care se întîlnesc 307 resturi de aminoacizi, din care 35% se găsesc sub formă de helix (există două regiuni de α-helix), 20% sub formă de structură pliată (atît paralel cît şi antiparalel) şi 45% se prezintă sub forma unei structuri dezordonate.

Enzimele sînt proteine globulare, în care resturile hidrofobe sînt orientate spre interior, în timp ce resturile polare sînt orientate spre exteriorul globulului, în direct contact cu solventul apos. Astfel, resturile de *Ala*

Val, *Leu* și *Ile*, întîlnite în structura enzimelor, datorită catenelor laterale *R* nepolare vor fi orientate spre interiorul structurii spațiale a enzimei, în timp ce resturile de *Ser*, *Thr* conținînd grupări hidroxil interacționează cu moleculele de apă din mediu celular stabilind legături de hidrogen și sînt distribuite la suprafață. Resturile acizilor monoaminodicarboxilici, *Glu* și *Asp* și resturile acizilor diaminomonocarboxilici, *Lys* și *Arg* care conțin grupări carboxil și respectiv amino, ionizate la valoarea *p*H fiziologic sînt, de asemenea, orientate spre exteriorul moleculei globulare a enzimei contribuind la stabilirea sarcinii electrice totale, adesea făcînd parte din constituția centrului catalitic activ și participînd la mecanisme de *cataliză acido-bazică*, în care substratul este legat prin interacții de tip electrostatic. Cisteina, deși este un aminoacid polar, la *p*H 7 nu ionizează și deci nu ia parte la formarea legăturilor de hidrogen; gruparea ei SH intră în constituția centrului catalitic activ al multor enzime. Prin oxidarea a două resturi de *Cys* rezultă punțile disulfurice în cadrul aceleiași catene polipeptidice (punți disulfurice intracatenare) sau între două catene polipeptidice distincte (punți disulfurice intercatenare), care joacă un rol deosebit de important în stabilizarea structurilor spațiale ale enzimelor.

Resturile de histidină, aminoacid ionizat la *p*H fiziologic, pot forma complecși de coordinare cu metalele tranziționale, participînd la cataliza enzimatică. *Structura terțiară a enzimelor*, care reprezintă o stare de organizare superioară datorată superplierii helixului sau/și interacțiilor catenelor laterale *R* ale resturilor de aminoacizi aduși în poziții vicinale datorită plierii catenei laterale, poate fi studiată prin diferite metode fizice care utilizează proprietățile hidrodinamice (mai ales viscozitatea), dar în special prin analiza difracției razelor *X* la trecerea acestora prin cristalele de enzimă purificată.

În 1965, P h i l l i p s și c o l a b., prin studii de difracție a razelor *X* la o rezoluție de 2 Å, stabilesc pentru prima dată structura terțiară a unei enzime — *muramidaza* — enzimă obținută în stare cristalină din albușul de ou.

Structura cuaternară a enzimelor, cel mai înalt nivel de organizare a macromoleculelor proteice a acestor biocatalizatori, apare numai în cazul *enzimelor oligomere*, alcătuite din mai multe catene polipeptidice.

După B e r n a l (care utilizează, în 1958, pentru prima dată termenul de structură cuaternară) structura cuaternară se referă la un sistem macromolecular constituit din subentități legate *necovalent* pe care le numește *subunități*. Conform acestei definiții, o proteină poate avea mai multe feluri de subunități. Cea mai mică subunitate ce poate fi eliberată din structura cuaternară fără ruperea unei legături covalente poartă numele de *monomer*. Aldolaza, de exemplu, conține patru monomeri identici cu o masă moleculară de 40 000 fiecare. Aspartat transcarbamilaza, prin disociere totală, eliberează șase monomeri identici cu funcție catalitică *(C)*, fiecare cu o masă moleculară de 33 000 și șase monomeri identici cu funcție reglatorie *(R)*, fiecare cu o masă moleculară de 17 000. Un monomer dintr-o enzimă dată poate fi constituit dintr-o singură catenă polipeptidică sau poate să conțină două sau mai multe catene legate prin legături covalente (de exemplu, prin punți disulfurice, legături între gruparea γ-carboxil a unui rest *Glu* și gruparea ε-amino a unui rest *Lys*).

Monomerul aldolazei este un exemplu de monomer constituit dintr-o singură catenă polipeptidică.

În 1965, M o n o d introduce şi noţiunea de *protomer* pentru cea mai mică subunitate care, prin asociere cu un număr de alte subunităţi identice generează structura cuaternară. În cazul aldolazei, noţiunile de monomer şi protomer sînt identice, în timp ce în exemplul aspartat transcarbamilazei protomerul este combinaţia *CR* ce conţine o subunitate catalitică şi o subunitate reglatoare, deoarece numai şase protomeri pot genera structura cuaternară. În acelaşi caz al aspartat transcarbamilazei se pot defini şi alte entităţi; subunitatea catalitică cu o masă moleculară de 100 000 (C_3) şi subunitatea reglatoare (R_3) cu o masă moleculară de 34 000.

În general, pentru orice stare asociată, formată din 2, 3 ... n monomeri sau protomeri, vom folosi terminologia de *oligomer*.

Glutamat dehidrogenaza este o enzimă tetrameră care prin diluarea soluţiei disociază în subunităţi a căror masă moleculară variază între 250 000 şi 350 000. În urma tratamentului cu uree sau cu dodecilsulfat de sodiu, subunitatea de 350 000 disociază în subunităţi identice a cîte 40 000 daltoni fiecare. Primele subunităţi (350 000) erau active din punct de vedere catalitic şi constituiau starea monomerică a enzimei, în timp ce subunităţile mici (40 000) erau inactive, disocierea fiind un proces ireversibil.

Catalaza este o enzimă cu o masă moleculară de 250 000 care formează microcristale subţiri, accesibile studiului electronomicroscopic (fig. 6.4). Investigaţiile chimice şi ultracentrifugarea au demonstrat că această enzimă este compusă din subunităţi.

V a l e n t i n e, în 1964, demonstrează prin cercetări electronomicroscopice că această enzimă este compusă din 18 catene polipeptidice de patru specii diferite, notate în figura 6.5 cu *A*, *B*, *C* şi *D*. Fiecare catenă are o masă moleculară de 14 000 şi este constituită din 120 resturi de aminoacizi. Singure, lanţurile *C* conţin cîte o grupare hem. O jumătate de moleculă conţine două subunităţi *ABA* (două catene *A* şi o catenă *B*) şi o

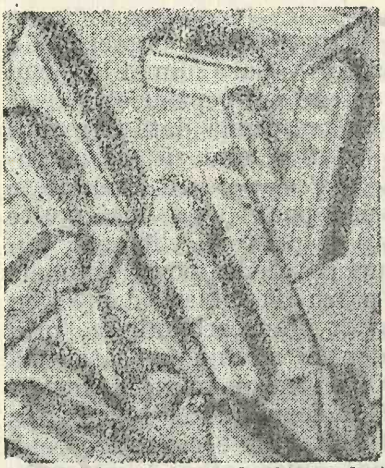


Fig. 6.4. — Microcristale de catalază din ficatul de bovine (mărire × 270) (după S u m n e r şi D o u n c e, 1937)

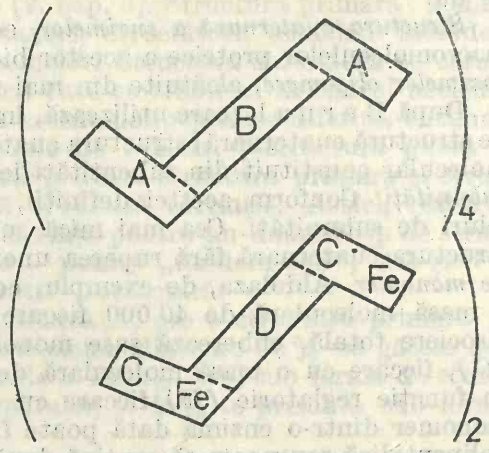


Fig. 6.5. — Modelul aranjării catenelor polipeptidice în structura cuaternară a catalazei cristalizată din ficatul de bovine (după V a l e n t i n e. 1964

subunitate *CDC* (două catene *C* și o catenă *D*), iar molecula întreagă, de catalază conține șase subunități, dintre care opt catene polipeptidice *A*, patru catene *B*, patru catene *C* și două catene *D*. De asemenea, per moleculă de enzimă se determină patru atomi de fier heminic.

În strînsă legătură cu structurile de ordin superior ale enzimelor, în ultimii 15 ani s-au pus bazele concepției despre *existența unor forme moleculare cu aceeași activitate catalitică*, numite *izoenzime*. Lactat dehidrogenaza este un exemplu de enzimă formată din patru catene polipeptidice (tetrameri). Se cunoaște că există cinci forme diferite ale acestei enzime, realizate prin combinări diferite ale celor două tipuri de catene polipeptidice : catena *M* ce predomină în țesutul muscular striat și catena *H* existentă în mușchiul cardiac. Aceste combinații : M_4; M_3H; M_2H_2; MH_3 și H_4 se numesc *izoenzime* și pot fi *diferențiate pe baza proprietăților lor electroforetice, catalitice și imunologice* și pe baza diferențelor de *structură primară*. Cînd țesuturile sînt vătămate, enzimele din celulă tind să părăsească spațiul intracelular și să treacă în sînge. Deoarece diferitele țesuturi au diverse forme de lactat dehidrogenază, o determinare a tipului găsit în sînge ne dă prețioase indicații privind diagnosticul unor boli.

După cum am mai arătat există enzime cu o *structură holoproteinică și enzime heteroproteide*. Din prima categorie fac parte *enzimele proteolitice* : *pepsina, tripsina, chimotripsina, chimozina*, mult studiata enzimă *ribonucleaza* etc. Din clasa enzimelor cu structuri *heteroproteidice* amintim : *carbonic anhidraza, carboxipeptidaza A, alcool dehidrogenaza, amilaza* etc. (metaloenzime), *catalaza și peroxidaza* (enzime care au în structura lor pe lîngă catena polipeptidică și grupări porfirinice împreună cu resturi glucidice), *aminotransferazele, aminoacidoxidazele* etc. (enzime care au în structura lor derivați ai vitaminelor, *piridoxal-5-fosfat și respectiv riboflavinadenindinucleotid* etc.).

Ribonucleaza este prima enzimă a cărei structură chimică a fost complet elucidată (fig. 6.6) demonstrîndu-se că este alcătuită dintr-o singură catenă polipeptidică constituită din 124 resturi de aminoacizi. Molecula prezintă la capătul N-terminal un rest de *Lys*, la capătul C-terminal un rest de *Val* și patru punți disulfurice în pozițiile 26—84 ; 40—95 ; 58—100 și 65—72. Analiza cristalografică și măsurătorile spectrale în infraroșu indică un procent de 40—50% α-helix. Studii cu reactivi de grup au permis cunoașterea *centrului activ al ribonucleazei* : *His*-12, *His*-119, *Lys*-41 și *Asn*-121.

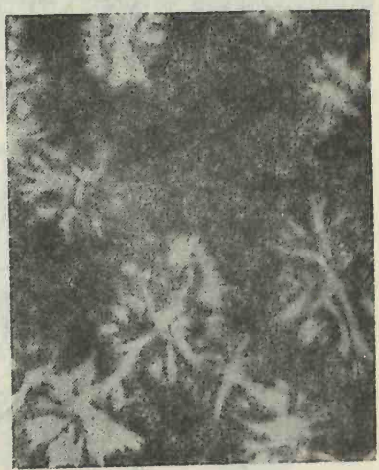


Fig. 6.6.— Cristale de ribonuclează purificată din pancreasul de bovine.

Ribonucleaza acționează asupra RNA în două etape : o *reacție de transesterificare*, deosebit de *rapidă*, care rezidă în depolimerizarea parțială cu formare de derivați fosforilați ciclici este urmată de o *reacție de hidroliză*, mai *lentă*, în care se eliberează grupări fosforil acide datorită scindării derivaților fosforilați ciclici ai nucleotidelor.

Carboxipeptidaza A este o enzimă cu acțiune exopeptidazică, catalizînd *hidroliza legăturilor peptidice de la capătul carboxil terminal al proteinelor-substrat*, scindînd în special acele legături la care participă resturi de aminoacizi cu catene laterale hidrofobe *(Leu)* și aromatice *(Phe, Trp)*. Anson izolează în stare cristalizată (fig. 6.7) această enzimă din pancreasul bovin și constată că este o zinc-proteină cu o masă moleculară de 34 600 și alcătuită din 300 resturi de aminoacizi. În urma studiilor cristalografice efectuate de Lipscomb, astăzi se știe că *molecula carboxipeptidazei A* are o *structură elipsoidală* cu 35% α-helix. Șase din cele nouă regiuni de α-helix se găsesc la suprafața moleculei, în partea stîngă (fig. 6.8). Prin centrul moleculei trece o structură pliată, atît paralel cît și antiparalel, ce reprezintă 20% din structura primară a enzimei. Zincul are o poziție adiacentă structurii pliate, fiind legat de componenta proteică prin intermediul a trei resturi de aminoacizi: *His*—69, *Glu*—72 și *Lys*— sau *Glu*—196. Cu excepția celorlalte trei regiuni helicate, jumă-

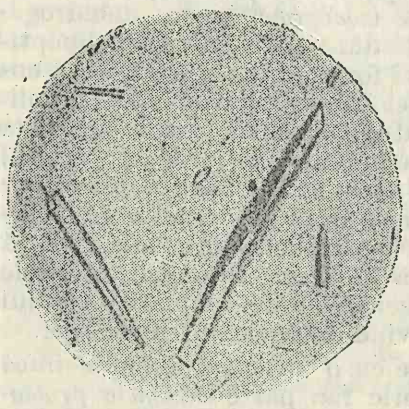


Fig. 6.7. — Cristale de carboxipeptidază (mărire × 85) purificată din pancreasul de bovine, după Anson.

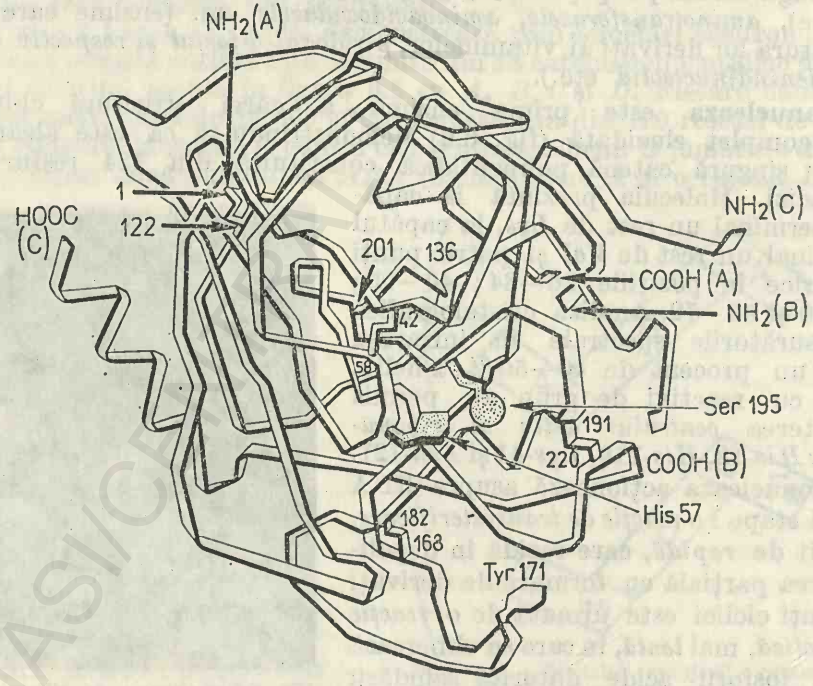


Fig. 6.8. — Modelul ipotetic al structurii carboxipeptidazei *A* alcătuit pe baza studiilor cristalografice de către Lipscomb.

tatea moleculei situată în partea dreaptă a structurii este dezordonată („random coil"). Structura posedă 10 legături de hidrogen și o legătură disulfurică flexibilă care reprezintă sediul celor mai multe modificări conformaționale care apar în cursul interacției enzimei cu substratul.

6.5.1. Zimogene și inhibitori naturali

Unele enzime sînt *biosintetizate într-o stare inactivă* din punct de vedere catalitic. IUB recomandă denumirea de *pre-enzime* pentru aceste *edificii moleculare care se activează în urma scindării hidrolitice a unei porțiuni din structura chimică ce blochează activitatea enzimatică*, dar sînt larg utilizate și denumirile de *zimogene* și *proenzime*. Aceste forme inactive din punct de vedere catalitic reprezintă, probabil, una din modalitățile prin care celula împiedică acțiunea unei anumite enzime atunci cînd necesitățile metabolice o cer.

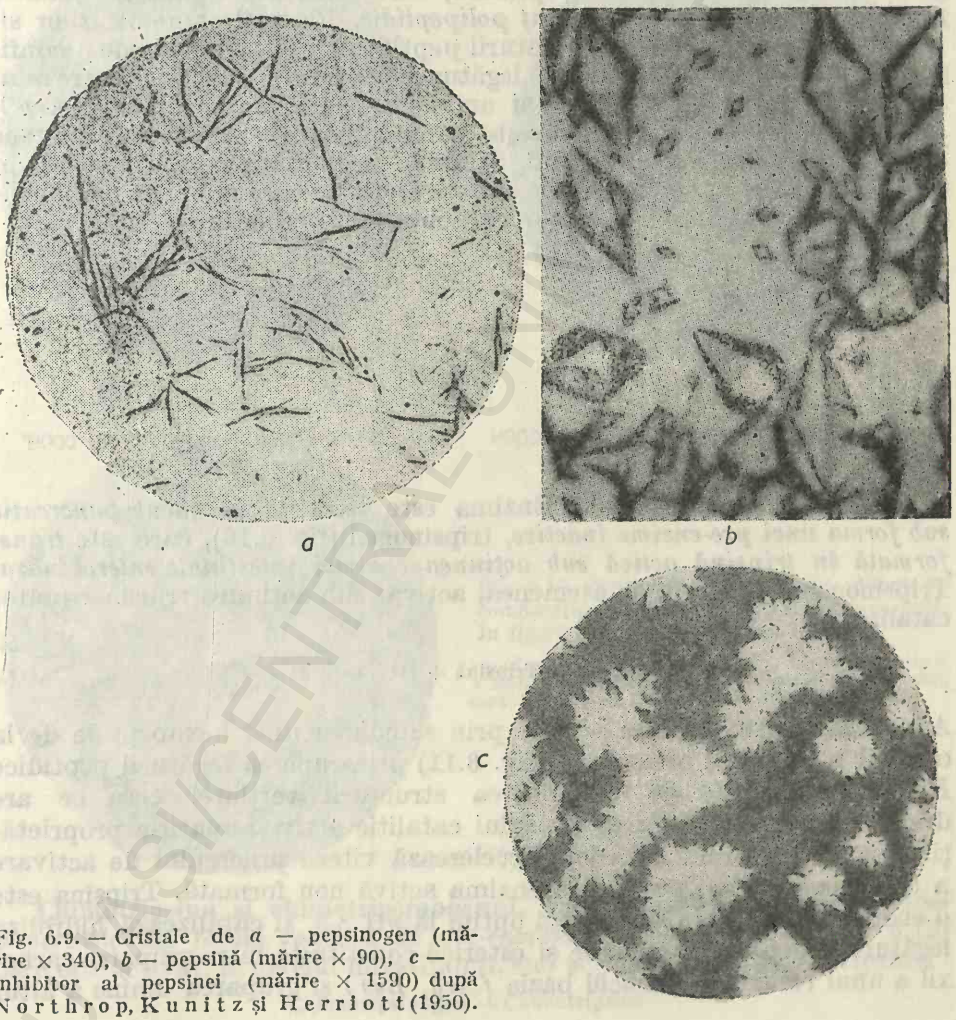
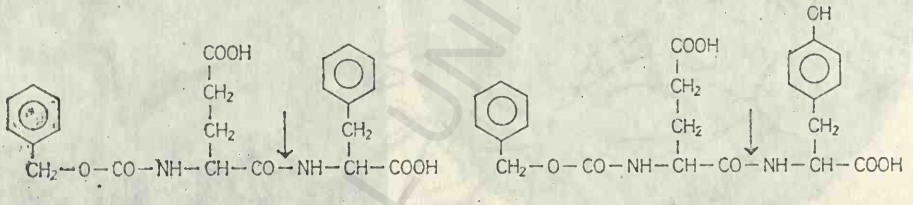


Fig. 6.9. — Cristale de *a* — pepsinogen (mărire × 340), *b* — pepsină (mărire × 90), *c* — inhibitor al pepsinei (mărire × 1590) după Northrop, Kunitz și Herriott (1950).

Pepsina și pepsinogenul. Enzima este *secretată de principalele celule ale stomacului sub formă de pre-enzimă inactivă*, numită *pepsinogen* (fig. 6.9, *a*), care este activat de ionii de H^+. Fenomenul de activare este însoțit de îndepărtarea unei polipeptide formate din 29 resturi de aminoacizi și cu o masă moleculară de 3 242, care reprezintă în același timp și un *inhibitor natural al pepsinei* (fig. 6.9, *c*). De asemenea, se mai formează cinci peptide mici a căror masă moleculară totală este de aproximativ 4 000.

Pepsinogen → Pepsină + Inhibitor + Cinci peptide

Activarea începe la un $pH<5$. Cînd încep să se formeze cantități mici de pepsină, aceasta contribuie, de asemenea, la procesul de activare, conferind acestuia un caracter autocatalitic. *p*H optim de acțiune al pepsinei este de 1,5—2,5 și coincide cu domeniul de *p*H normal al sucului gastric. *Pepsina* este o *endopeptidază*, care *scindează exclusiv legăturile peptidice din interiorul unui lanț polipeptidic*. Resturile aminoacizilor situate de o parte și de alta a legăturii peptidice trebuie să posede o configurație *L*, mai ușor fiind scindate legăturile peptidice constituite între aminoacizi aromatici *(Phe, Tyr)* și aminoacizi dicarboxilici *(Glu, Asp)*. Acilarea grupării α-amino sporește probabilitatea ca enzima să atace legătura peptidică a substratului. Studiul specificității de substrat a pepsinei a fost realizat, pe substrate sintetice, dintre care amintim carbobenzoxi-*L*-glutamil-*L*-fenilalanina și carbobenzoxi-*L*-glutamil-*L*-tirozina.

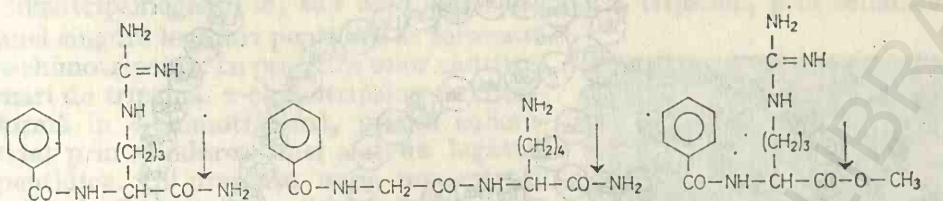


Tripsina și tripsinogenul. Enzima este *secretată în sucul pancreatic sub forma unei pre-enzime inactive*, tripsinogen (fig. 6.10), care este *transformată în tripsină activă sub acțiunea enzimei intestinale enterokinaza*. Tripsinogenul poate fi, de asemenea, activat sub acțiunea tripsinei (autocataliză):

Tripsinogen → Tripsină + Hexapeptidă

Activarea tripsinogenului se face prin scindarea unei hexapeptide de la capătul N-terminal al acesteia (fig. 6.11) prin ruperea legăturii peptidice *Ile*-7-*Lys*-6 însoțită de modificarea structurii terțiare, ceea ce are drept efect final eliberarea situsului catalitic activ și apariția proprietăților catalitice. Ionii de calciu accelerează viteza procesului de activare a tripsinogenului și protejează enzima activă nou formată. Tripsina este o endopeptidază care acționează optim la *p*H 8,5 și catalizează hidroliza legăturilor peptidice, amidice și esterice constituite între gruparea carboxil a unui rest de aminoacid bazic *(Arg, Lys)* și gruparea amino a altui

rest de aminoacid sau gruparea hidroxil a unui alcool. Activitatea catalitică a tripsinei a fost testată în experienţe utilizînd substrate sintetice, dintre care amintim benzoil-L-argininamida, hipurillizinamida şi esterul metilic al benzoilargininei :



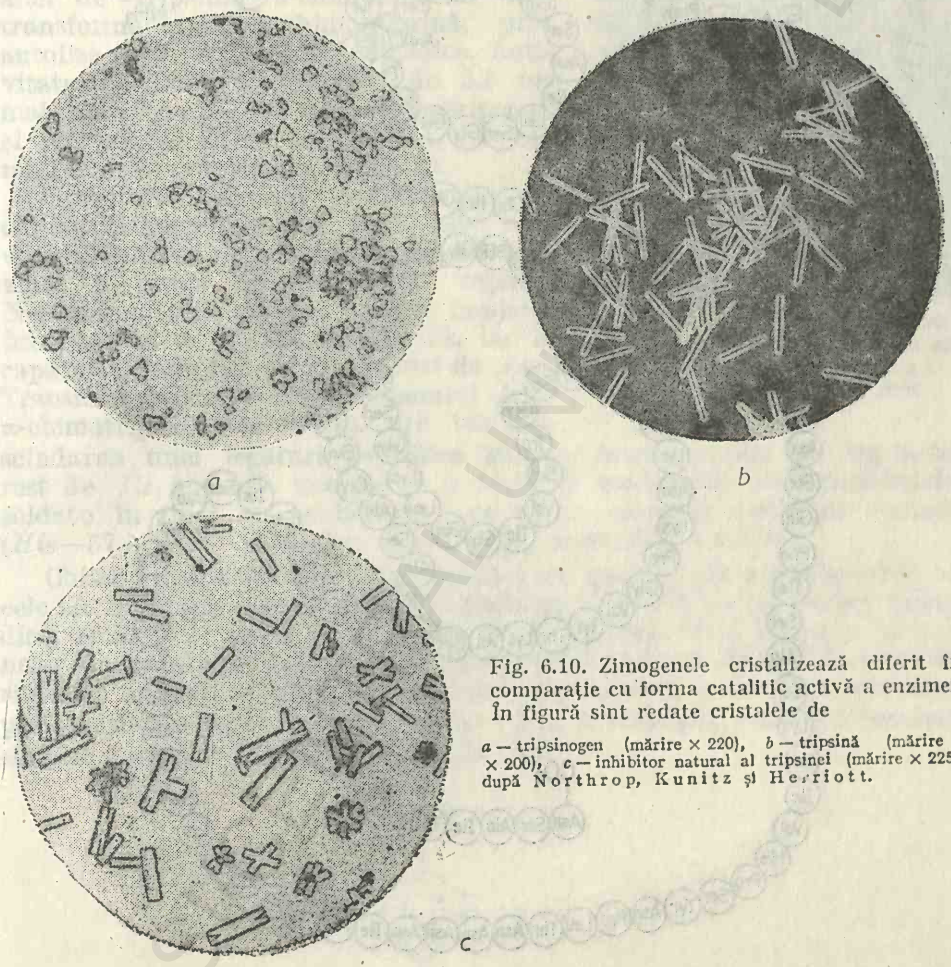


Fig. 6.10. Zimogenele cristalizează diferit în comparaţie cu forma catalitic activă a enzimei. În figură sînt redate cristalele de *a* — tripsinogen (mărire × 220), *b* — tripsină (mărire × × 200), *c* — inhibitor natural al tripsinei (mărire × 225), după Northrop, Kunitz şi Herriott.

Chimotripsina şi chimotripsinogenul. Enzima este *secretată în sucul pancreatic sub formă inactivă de pre-enzimă, chimotripsinogen* (fig. 6.12) care este activat, la nivelul intestinului, sub acţiunea catalitică a tripsinei :

Chimotripsinogen → Chimotripsină

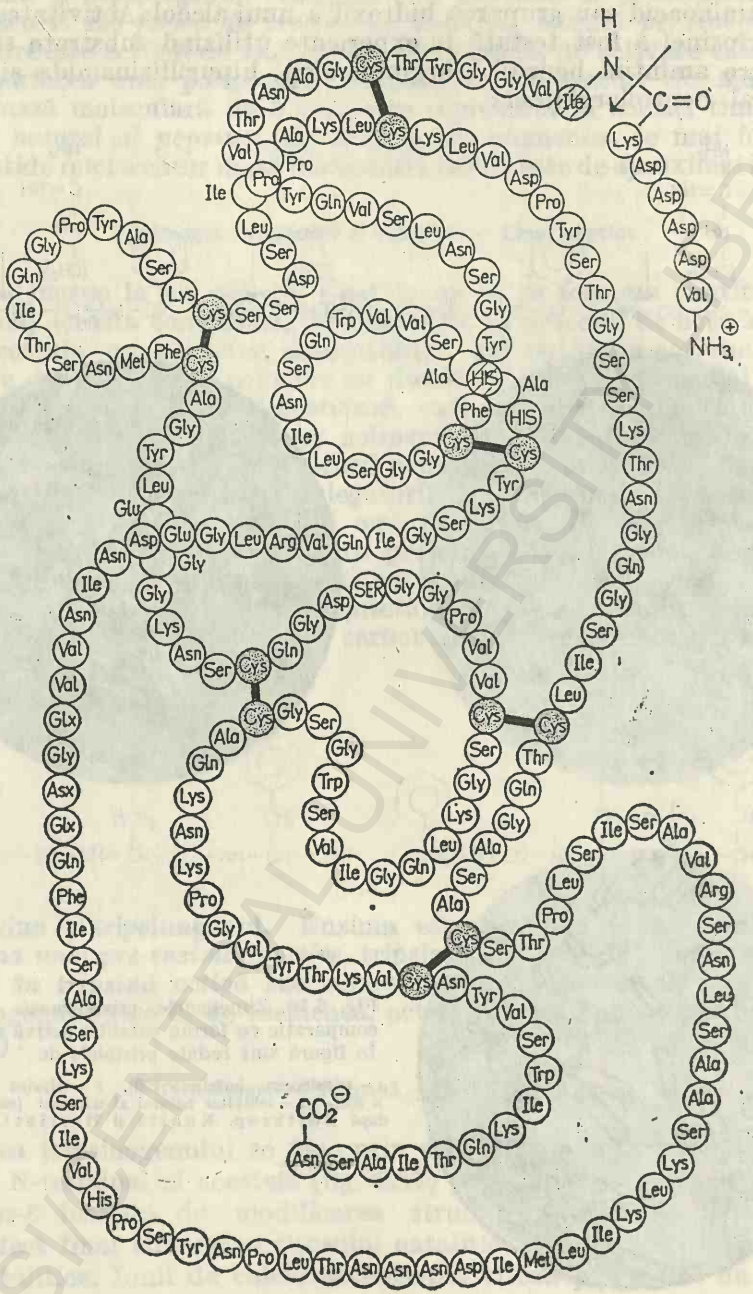


Fig. 6.11. — Structura primară a tripsinogenului. Săgeata indică legătura peptidică hidrolizată în timpul activării zimogenului.

Caracteristic pentru sistemul chimotripsinogen/chimotripsină este varietatea formelor active care se pot obține. În sucul pancreatic există două pre-enzime, ale căror concentrații variază cu specia animală din care s-a izolat pancreasul: *chimotripsinogenul A* și *chimotripsinogenul B*. Din chimotripsinogenul *A*, sub acțiunea catalitică a tripsinei, prin scindarea unei singure legături peptidice se formează π-chimotripsina. În prezența unor cantități mari de tripsină, π-chimotripsina se transformă în δ-chimotripsină, proces concretizat prin scindarea unei a doua legături peptidice. În prezența unor concentrații mici de tripsină, π-chimotripsina este transformată în α-chimotripsină, prin autoliza a 2—4 legături peptidice. Activitatea π-chimotripsinei este de 2,5 ori mai mare decît cea a α-chimotripsinei și reprezintă forma enzimatică cu cea mai înaltă capacitate catalitică.

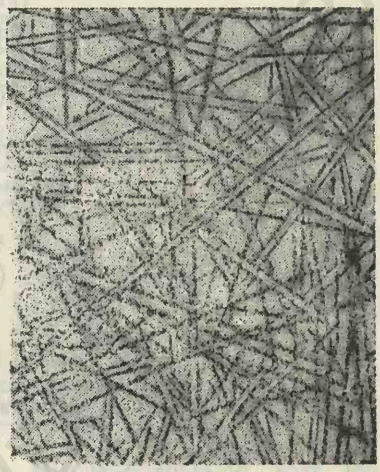
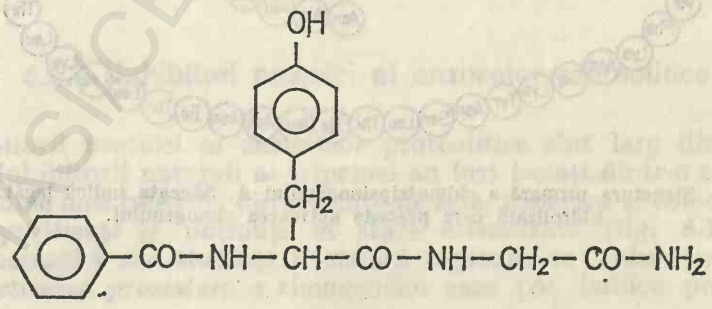


Fig. 6.12. — Cristale de chimotripsinogen (mărire × 260), purificat din pancreasul de bovine de Kunitz și Northrop (1935, 1936).

Structura primară a moleculei de chimotripsinogen *A* (fig. 6.13) este constituită din 246 resturi de aminoacizi, prezintă 5 punți disulfurice, la capătul N-terminal este un rest de *Cys* implicat într-o astfel de punte disulfurică, iar la capătul C-terminal există un rest de *Asn*. Transformarea chimotripsinogenului *A* în π-chimotripsină (fig. 6.14), are loc prin scindarea unei legături peptidice situate între un rest de *Arg* și un rest de *Ile*, urmată imediat de o serie de modificări conformaționale, soldate în final cu „eliberarea" centrului catalitic activ al enzimei (*His*—57 și *Ser*—195), deci cu apariția activității catalitice.

Chimotripsina este o endopeptidază cu proprietăți asemănătoare cu cele ale tripsinei, care catalizează scindarea hidrolitică a legăturilor peptidice, amidice și esterice; principalul rol fiziologic fiind hidroliza proteinelor alimentare parțial hidrolizate de pepsina gastrică. Studii cu substrate sintetice au indicat că această enzimă proteolitică catalizează scindarea preferențială a legăturii peptidice *Tyr—Gly*, de exemplu, cea din substratul sintetic: benzoil-L-tirozilglicinamida:



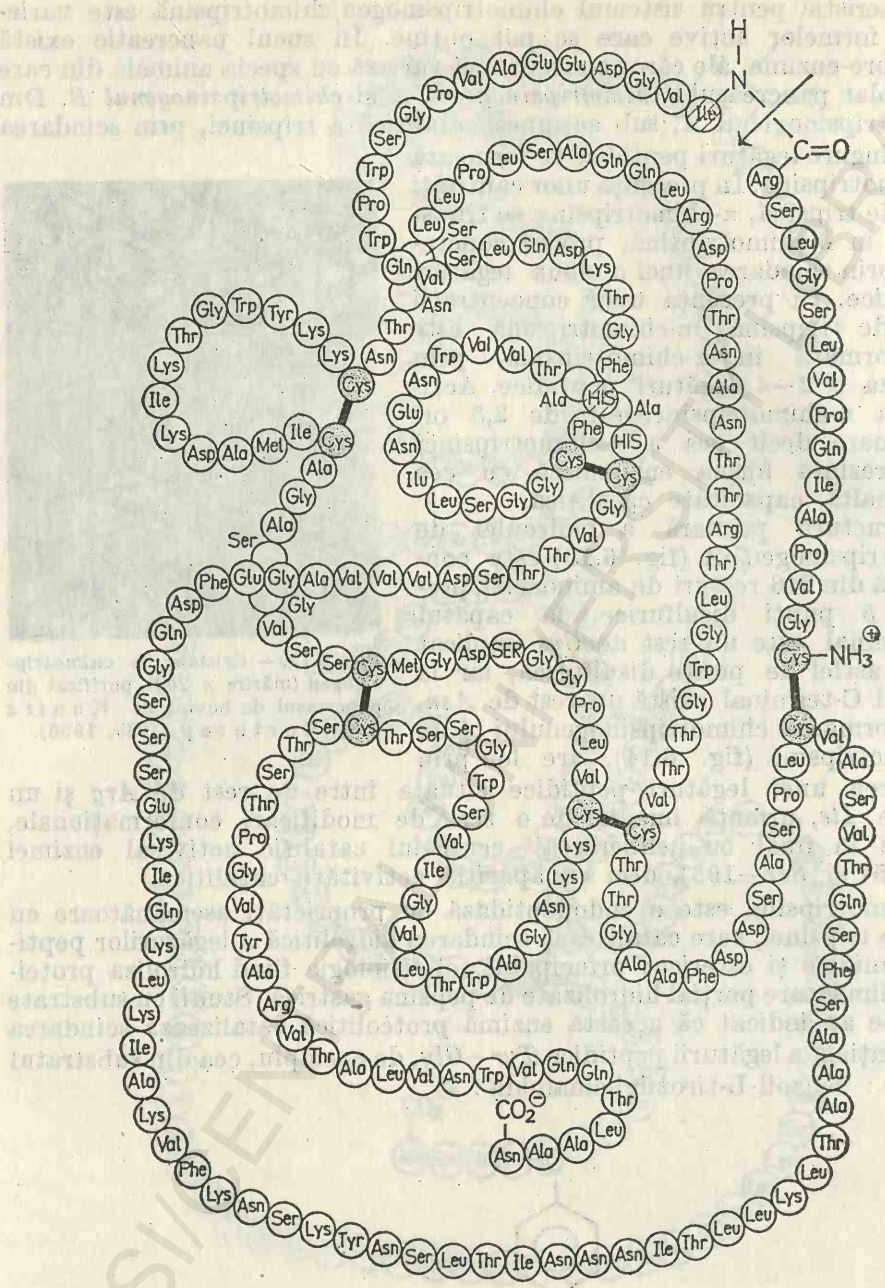


Fig. 6.13. — Structura primară a chimotripsinogenului *A*. Săgeata indică legătura peptidică hidrolizată care precede activarea zimogenului.

Acțiunea chimotripsinei nu este restrînsă numai la legături peptidice, amidice și esterice la care participă aminoacizi aromatici *Tyr*, *Trp*, *Phe*; legăturile în care sînt implicate resturi de *Leu*, *Met*, *Asn* și *Gln* sînt, de asemenea, scindate cu viteză mare.

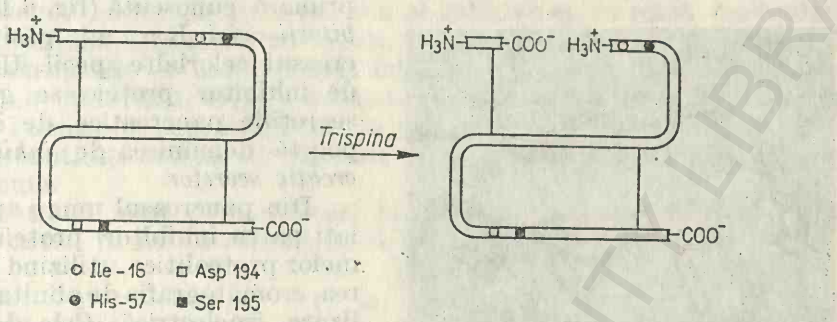


Fig. 6.14. — Modificările conformaționale care însoțesc activarea chimotripsinogenului *A*. În urma activității tripsinei, gruparea α-NH_2 a restului de izoleucină din poziția 16 este eliberată. Centrul catalitic al enzimei active include *Asp*-194 și *Ser*-195 și *His*-57

Carboxipeptidaza și procarboxipeptidaza. Din pancreas au fost izolate două *carboxipeptidaze A* și *B*, enzime cu *activitate exopeptidazică*, care *catalizează scindarea hidrolitică a legăturilor peptidice* din vecinătatea extremității C-terminale a substratelor proteice. Carboxipeptidaza *A* este elaborată sub forma unui precursor inactiv din punct de vedere catalitic, procarboxipeptidaza *A*, care sub acțiunea catalitică a tripsinei suferă un fenomen de activare. Zimogenul, purificat din pancreas bovin, s-a dovedit a avea o structură agregată formată din doi sau trei monomeri. Trimerul este format dintr-o subunitate I care este adevăratul precursor al carboxipeptidazei *A* și din subunitățile II și III care sînt precursorii unor endopeptidaze. Dimerul conține numai subunitățile I și II. Procesul de *activare constă din scindarea unei legături peptidice de la extremitatea N-terminală* soldată cu formarea carboxipeptidazei *A* și a unei polipeptide inactive constituită din 60 resturi de aminoacizi.

Procarboxipeptidaza → Subunitate I + Subunități II + III
↙ ↘
Carboxipeptidaza *A* + Polipeptidă inertă

6.5.2. Inhibitori proteici ai enzimelor proteolitice

Inhibitorii proteici ai enzimelor proteolitice sînt larg distribuiți în natură. Inhibitorii naturali ai tripsinei au fost izolați dintr-o mare varietate de surse naturale; cei din semințe de soia, pancreas și colostru au fost izolați, purificați și obținuți în stare cristalizată (fig. 6.15). Inhibitorii pancreatici sînt studiați în strînsă legătură cu *rolul lor protector pentru activarea prematură a* zimogenelor care pot induce procese dis-

tructive la nivelul ţesutului pancreatic. Acesta conţine o serie de inhibitori proteici ai enzimelor proteolitice, cu mase moleculare mici. Aceşti inhibitori au fost clasificaţi în două tipuri majore : *inhibitorul pancreatic bazic* — numit şi *inhibitorul* Kunitz şi Northrop, găsit numai în pancreasul rumegătoarelor, cu masa moleculară de 6 000 şi cu structura primară cunoscută (fig. 6.16) şi *inhibitorii acizi* Kazal găsiţi în pancreasul celorlalte specii. Ultimul tip de inhibitor proteic se găseşte în secreţiile pancreatice, de aceea mai poartă denumirea de *inhibitor pancreatic secretor*.

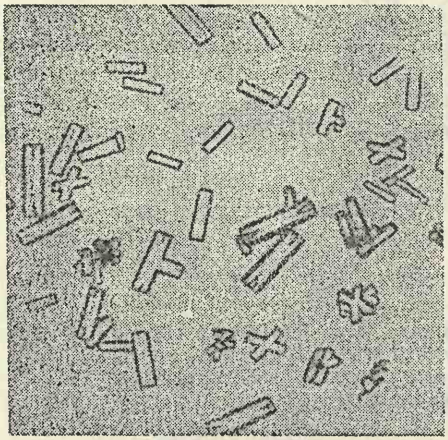


Fig. 6.15. — Cristalele inhibitorului tripsinei izolat din glanda pancreatică de bovine de Kunitz şi Northrop (1950).

Din pancreasul uman au fost izolaţi patru inhibitori proteici ai enzimelor proteolitice, utilizînd gel filtrarea, cromatografia de afinitate şi focalizare izoelectrică. Cele două componente majore responsabile pentru majoritatea activităţii inhibitorie sînt de tip Kazal. Componentul cel mai bazic are un punct izoelectric la *p*H 8,7 şi conţine 48 resturi de aminoacizi, avînd o masă moleculară de 5 240 ; cel mai acid posedă pH_t la 6,5 şi are 39 resturi de aminoacizi, cu o masă moleculară de 4 330. În prezenţa tripsinei sau în mediu acid, între cele două componente apare un proces de intertransformare. Ambele componente inhibă tripsina bovină şi umană, acţionează slab asupra

1 5 10 15 20
Arg-Pro-Asp-Phe-Cys-Leu-Glu-Pro-Pro-Tyr-Thr-Gly-Pro-Cys-Lys-Ala-Arg-Ile-Ile-Arg-Tyr-Phe-

25 30 35 40
-Tyr-Asp-Ala-Lys-Ala-Gly-Leu-Cys-Gly-Thr-Phe-Val-Tyr-Gly-Gly-Cys-Arg-Ala-Lys-Arg-Asn-

45 50 55 58
Asn-Phe-Lys-Ser-Ala-Glu-Asn-Cys-Met-Arg-Thr-Cys-Gly-Gly-Ala

Fig. 6.16. — Structura primară a inhibitorului tripsinei izolat din pancreasul de bovine. În structura primară a inhibitorului tripsinei izolat din plămîn, restul de acid aspartic din poziţia 50 este înlocuit cu un rest de asparagină.

chimotripsinei bovine şi sînt indiferente faţă de chimotripsina umană. Inhibitorul Kazal are un puternic caracter anionic, în structura lui predominînd resturile aminoacizilor monoaminodicarboxilici, reacţionează spontan şi specific numai cu tripsina.

Din veninul unor şerpi *(Hemachatus haemachatus, Naja nivea, Naja naja*, etc.) au fost izolaţi inhibitori proteici ai tripsinei, chimotripsinei, kalikreinei şi plasminei. Spectrul de inhibiţie al acestor inhibitori este similar cu cel al preparatului purificat din colostru bovin şi diferă mult de inhibitorul Kazal. Aceşti inhibitori proteici au mase moleculare

mici (6 300 pentru inhibitorul izolat din *H. hemachatus)* şi nu conţin resturi glucidice asemenea preparatelor izolate din pancreasul mamiferelor. Nu au acţiune asupra trombinei bovine, exopeptidazelor, tiol-proteinazelor (papaină, bromelaină şi ficină) şi nici asupra proteazelor bacteriene *(subtilizina BPN, termolizina* şi *pronaza)*. În 1971, după 40 de ani de la descoperirea inhibitorului natural al kalikreinei, cu masă moleculară mică, din diferite organe ale bovinelor, B é r e s s izolează inhibitori similari din anemonele de mare. Aceşti inhibitori au aceeaşi specificitate de inhibiţie ca inhibitorul tripsin-kalikreinei care apare numai la bovine şi caprine. Funcţia acestor inhibitori în anemonele de mare a rămas necunoscută; cantităţi extrem de mari ale acestor inhibitori au fost decelate în tentacule.

Concentraţii mari de inhibitori proteinazici au fost evidenţiate în *Helix pomatia*, în *Loligo vulgaris* şi la nematelminţi (fig. 6.17).

1 5^{CM} 10 15 ^{CM} 20^{CM}
Glu-Ala-Glu-Lys-Cys-(Asx, Glx, Glx, Pro, Gly, Trp)-Thr-Lys-Gly-Gly-Gly-Cys-Glu-Thr-Cys-

^{CM} 25 ^{CM} 30 35 ^{CM} 40
-Gly-Cys-Ala-Gly-Lys-Ile-Val-Pro-Cys-Thr-Arg-Glu-Thr-Lys-Pro-Asn-Pro-Gln-Cys-Pro-Arg-

^{CM} 45^{CM} 50 55 60^{CM}
-Lys-Gln-Cys-Cys-Ile-Ala-Ser-Ala-Gly-Phe-Val-Arg-Asp-Asp-Ala-Gln-Gly-Asn-Cys-Ile-Lys-Phe-

65 ^{CM} 68
-Glu-Asp-Cys-Pro-Lys.

Fig. 6.17. — Structura primară a inhibitorului tripsinei izolat de la *Ascaris lumbricoides*. Inhibitorul a fost redus şi carboximetilat la nivelul resturilor de *Cys*; în paranteză este redată secvenţa asupra căreia planează incertitudini.

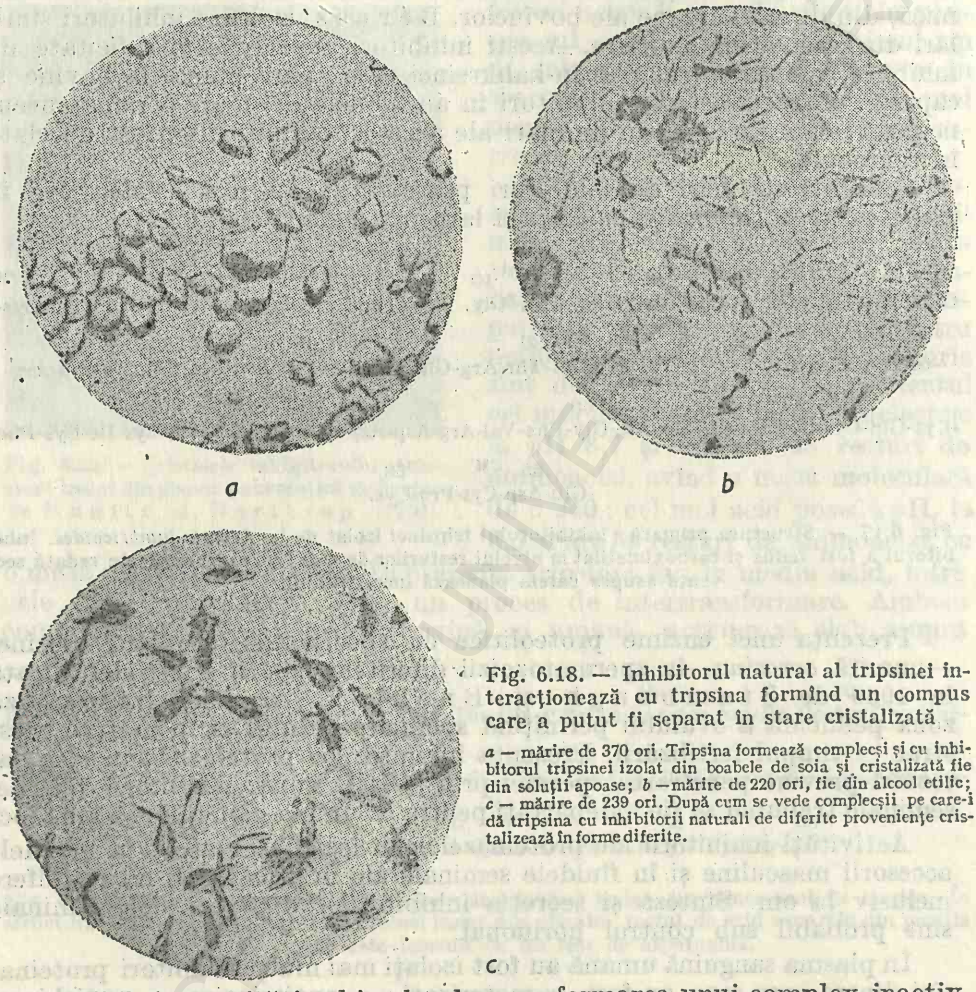
Prezenţa unei enzime proteolitice cu specificitate similară tripsinei —numită *acrozina*—în spermatozoizii diferitelor specii a fost identificată în 1969 de S t a m b a u g h şi B u c k l e y. Acrozina îndepărtează zona pellucida a ovulului permiţînd spermatozoidului să penetreze acest strat în timpul fertilizării. Prezenţa inhibitorilor proteinazici în spermatozoizi previne penetrarea spermei prin această zonă, inhibitorii plasmei seminale trebuind să fie îndepărtaţi pentru ca unirea gameţilor să aibă loc.

Activităţi inhibitorii ale proteinazelor au fost observate şi în glandele accesorii masculine şi în fluidele seminale ale multor specii de mamifere inclusiv la om. Sinteza şi secreţia inhibitorilor din veziculele seminale sînt probabil sub control hormonal.

În plasma sanguină umană au fost izolaţi mai mulţi inhibitori proteinazici dintre care şase au fost caracterizaţi: α_1-antitripsina, α_1-antichimotripsina, inter-α-tripsininhibitorul, antitrombina III, C-1-inactivatorul, α_2-macroglobulina. Dintre cei şase, α_1-antitripsina şi α_2-macroglobulina sînt importante datorită concentraţiei lor mari în plasmă şi specificităţii; ceilalţi sînt prezenţi numai în urme. Toţi inhibitorii proteinazici din plasmă sînt glicoproteide, dar nu se cunoaşte dacă componenta glucidică este necesară pentru funcţia inhibitorie. Ea poate fi de mare importanţă pentru transportul activ prin membrana celulară.

În seminţele leguminoaselor negerminate apar cantităţi mari din inhibitorii proteici ai diferitelor hidrolaze, în legătură cu menţinerea stării

fiziologice de *dormans*. Odată cu începerea proceselor germinative, cînd procesele hidrolitice sînt mult intensificate în vederea „hrănirii" plantulei, prezența inhibitorilor proteici nu mai poate fi decelată. Din semințele de soia a fost izolat, în 1946, un inhibitor natural al tripsinei, (fig. 6.18) numit *inhibitorul* B o w m a n-B i r k. Acesta reacționează cu tripsina



a *b*

c

Fig. 6.18. — Inhibitorul natural al tripsinei interacționează cu tripsina formînd un compus care a putut fi separat în stare cristalizată

a — mărire de 370 ori. Tripsina formează complecși și cu inhibitorul tripsinei izolat din boabele de soia și cristalizată fie din soluții apoase; *b* — mărire de 220 ori, fie din alcool etilic; *c* — mărire de 239 ori. După cum se vede complecșii pe care-i dă tripsina cu inhibitorii naturali de diferite proveniențe cristalizează în forme diferite.

ireversibil, în cantități echimoleculare cu formarea unui complex inactiv. Inhibitorul este stabil în soluții tamponate, diluate, în domeniul de *p*H 1—12. Punctul izoelectric al inhibitorului tripsinei din soia, obținut în stare cristalizată, este la *p*H 4,5, avînd o masă moleculară de aproximativ 24 000. Acest inhibitor proteic poate fi denaturat prin tratamente cu acizi sau baze în concentrații relativ mari, temperaturile peste 40°C denaturîndu-l reversibil. Acest inhibitor vegetal are caracteristicile inhibitorului K u n i t z.

În 1973, W i l s o n și L a s k o w s k i au izolat trei *izoinhibitori* din *Phaseolus vulgaris*, care se aseamănă mult cu alți inhibitori de masă mole-

culară mică izolați din diferite leguminoase, precum și cu inhibitorul B o w m a n-B i r k izolat din soia. Ei au mase cuprinse între 8 000 și 10 000 și conțin resturi de *Ser*, *Asp* și cistină. Lipsesc *Trp* și hidrați de carbon. Cei trei izoinhibitori diferă în ceea ce privește capacitatea inhibitorie raportată la tripsina bovină și α-chimotripsina bovină.

Ovomucoidul izolat din ouăle de găină prezintă o puternică activitate inhibitorie față de tripsină. În afara ovomucoidului, M a t s u s h i m a izolează un nou inhibitor proteic, pe care-l numește *ovoinhibitor* și care acționează asupra enzimelor proteolitice din *Bacillus subtilis* și *Aspergillus*. Acești inhibitori sînt *glicoproteine* cu un conținut relativ mare de *acid sialic*.

Descoperirea inhibitorilor proteici naturali pentru o serie de enzime a contribuit la înțelegerea mecanismelor de autoreglare celulară, grație cărora se menține integritatea celulei.

6.6. CINETICA ENZIMATICĂ

Reacțiile spontane, în care unul sau mai mulți reactanți se transformă instantaneu în produși, sînt extrem de rare. În majoritatea cazurilor, reactantului (reactanților) trebuie să i se furnizeze o cantitate de energie numită *energie de activare*, necesară trecerii acestuia într-o stare reacționabilă. Catalizatorii, în general și *enzimele în special accelerează reacțiile posibile din punct de vedere termodinamic, micșorînd tocmai valoarea acestei energii de activare*. În figura 6.19 se prezintă diagrama variației energiei

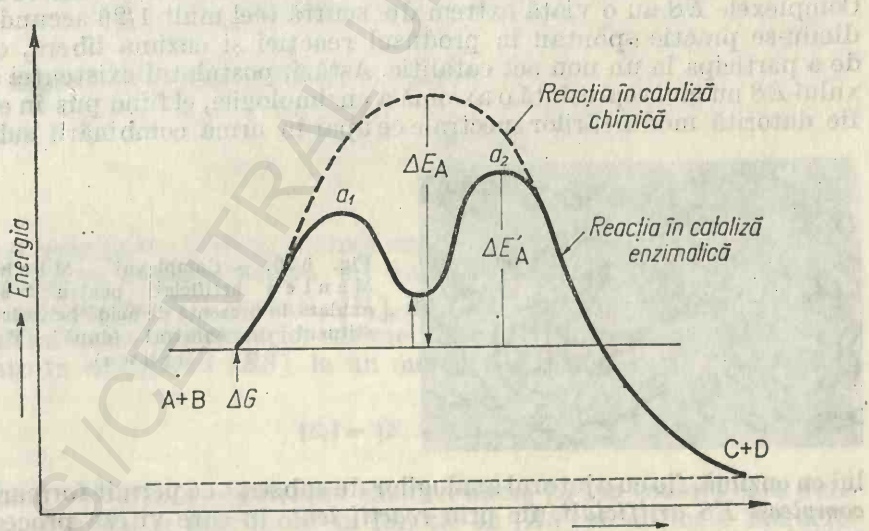


Fig. 6.19. — Diagrama variației energiei libere (ΔG) în cursul reacțiilor catalizate și necatalizate. Pentru reacția A + B → C + D, ΔE_A și $\Delta E'_A$ reprezintă variațiile energiilor de activare în cele două reacții.

libere în cursul reacţiilor catalizate şi necatalizate. Se constată existenţa unei *stări de tranziţie*, bogată în energie, care constituie o adevărată barieră energetică pe care trebuie s-o depăşească moleculele reactantului pentru a reacţiona. Enzima micşorează valoarea energetică a acestei bariere. Caracteristicile generale ale cineticii reacţiilor chimice sînt valabile şi în cazul cineticii enzimatice, cu singura excepţie că în ultimul caz este general valabil principiul *saturării enzimei cu substratul. Viteza reacţiilor enzimatice* creşte proporţional cu concentraţia substratului pînă la o anumită valoare a acestuia, după care oricît de mult am mări concentraţia substratului viteza rămîne constantă — de fapt se înregistrează viteza maximă a reacţiei enzimatice (V_{max}), factorul care limitează viteza fiind numai concentraţia enzimei. Pentru toate enzimele este valabilă relaţia :

$$v = k\,[E]$$

unde : v este viteza reacţiei enzimatice ; k — constantă de proporţionalitate ; $[E]$ — concentraţia enzimei în mediu de reacţie.

La baza cineticii enzimatice stă postulatul existenţei unui complex deosebit de reactiv — complexul enzimă-substrat, denumit şi *complexul* Michaelis-Menten în cinstea a doi mari pionieri ai enzimologiei moderne care au pus bazele matematice ale cineticii enzimatice. Cea mai simplă reacţie enzimatică poate fi descrisă de ecuaţia :

$$E + S \rightarrow ES \rightarrow E + P$$

unde : S este simbolul substratului şi P simbolul produsului de reacţie.

În această reacţie enzimatică enzima se uneşte cu substratul prin situsul ei catalitic activ cu formarea complexului *ES*, bogat în energie, realizînd în felul acesta scăderea energiei libere de activare a moleculelor *S*. Complexele *ES* au o viaţă extrem de scurtă (cel mult 1/26 secunde) scindîndu-se practic spontan în produsul reacţiei şi enzima liberă, capabilă de a participa la un nou act catalitic. Astăzi, postulatul existenţei complexului *ES* nu mai reprezintă o axiomă a enzimologiei, el fiind pus în evidenţă fie datorită modificărilor spectrale ce apar în urma combinării substratului cu enzimă, fie cu ajutorul analogilor de substrat ce permit formarea unor *complecşi ES artificiali*, fie prin *reacţii lente* în care viteza proceselor ce apar într-un act catalitic este „îngheţată" prin utilizarea unor parametri cît mai depărtaţi de valoarea parametrilor optimi de acţiune ai enzimei (fig. 6.20). Primii complecşi Michaelis-Menten au fost evidenţiaţi de Chance şi Theorell în cazul a două enzime fier-porfirinice —

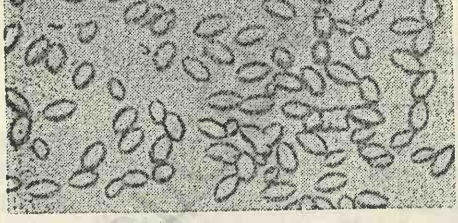


Fig. 6.20. — Complexul Michaelis-Menten artificial pentru *D*-aminoacid oxidaza în prezenţă de acid benzoic ca substituent de substrat (după Yagi şi Ozawa).

catalaza şi peroxidaza — urmărind spectrofotometric extincţia moleculară la 403 nm care reprezintă maximul de absorbţie al grupării prostetice — hemul. Adiţia apei oxigenate la un preparat de catalază conduce la deplasarea maximului de absorbţie la 410 nm şi scăderea extincţiei moleculare — modificări spectrale care sugerează că fixarea substratului are loc la nivelul Fe^{3+} porfirinic al catalazei.

Teoria cineticii reacţiilor enzimatice a fost elaborată în perioada 1905—1925 de Henri, Menten, Michaelis, Haldane, Briggs şi a rămas valabilă în anumite cazuri şi astăzi. Ultimii doi elaborează teoria stării staţionare conform căreia în orice moment al unei reacţii enzimatice vitezele de formare şi de scindare ale complexului *ES* sînt aproximativ egale, aşa încît pentru o scurtă perioadă de timp concentraţia complexului *ES* poate fi considerată constantă. Pentru ecuaţia

$$E + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \underset{k_4}{\overset{k_3}{\rightleftharpoons}} E + P$$

unde k_1, k_2, k_3 şi k_4 sînt constantele de viteze respective, condiţia stării staţionare poate fi descrisă de relaţia:

$$k_1[E][S] + k_4[E]\cdot[P] = k_2[ES] + k_3\,[ES]$$

Deoarece în enzimologie sînt considerate numai *vitezele iniţiale de reacţie*, care corespund perioadei cînd concentraţia produsului este atît de mică încît poate fi neglijată, relaţia de mai sus se poate simplifica la forma:

$$k_1[E][S] = [ES]\,(k_2 + k_3),$$

în care explicitînd constantele de viteză

$$K_M = \frac{k_2 + k_3}{k_1} = \frac{[E]\cdot[S]}{[ES]},$$

obţinem o constantă cinetică, numită *constantă* Michaelis, care defineşte afinitatea enzimei pentru un anumit substrat.

Concentraţia totală a enzimei, $[E_t]$, de la începutul reacţiei enzimatice este egală cu suma concentraţiei enzimei libere $[E]$ şi a concentraţiei enzimei legate în complexul $[ES]$ la un moment al reacţiei.

$$[E_t] = [E] + [ES].$$

Introducînd valoarea concentraţiei enzimei libere $[E]$ în ecuaţia care defineşte valoarea K_M şi exprimînd în funcţie de $[ES]$ se obţine o nouă relaţie:

$$[ES] = \frac{[E_t]\cdot[S]}{[S] + K_M}.$$

Dacă se ţine seama că viteza reacţiei enzimatice depinde de concentraţia $[ES]$ şi că viteza maximă V_{max} se înregistrează cînd toată cantitatea de enzimă se află legată în complexul ES,

$$v = k_3\,[ES],$$

$$V_{max} = k_3 \cdot [E_t],$$

ecuaţia care redă valoarea lui ES devine:

$$v = \frac{V_{max} + [S]}{K_M + [S]}.$$

Această ultimă ecuaţie poartă numele de *relaţie* Michaelis-Menten şi este expresia vitezei de reacţie în funcţie de concentraţia substratului, ţinînd seama de două constante cinetice: *viteza maximă de reacţie* V_{max} şi *constanta* Michaelis K_M. Reprezentarea grafică a ecuaţiei Michaelis-Menten în care pe abscisă se notează concentraţia substratului, iar pe ordonată, viteza de reacţie v conduce la obţinerea unei părţi dintr-o hiperbolă rectangulară (fig. 6.21), care tinde asimptotic către o valoare maximă a vitezei — V_{max}. Această constantă cinetică variază de la o enzimă la alta, fiind funcţie de natura substratului, de pH, de temperatură şi se exprimă în micromoli/ml/min/t°C. Cea de a doua constantă cinetică, constanta Michaelis este independentă de concentraţia enzimei. Dacă în ecuaţia Michaelis-Menten se consideră cazul particular,

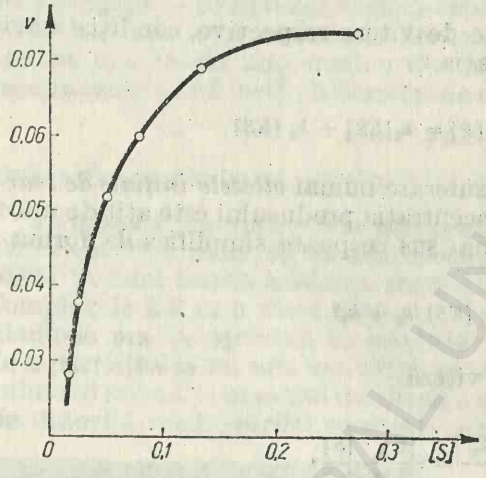


Fig. 6.21. — Variaţia vitezei de reacţie în funcţie de concentraţia substratului — reprezentarea Michaelis-Menten.

$$v = 1/2\ V_{max},$$

şi se operează simplificările corespunzătoare, se obţine relaţia:

$$K_M = [S],$$

care ne indică situaţia cînd K_M este egală cu concentraţia substratului la care viteza de reacţie este egală cu jumătatea vitezei maxime posibile. Deci K_M are dimensiunile unei concentraţii şi prezintă valori cuprinse între 10^{-1}M şi 10^{-8}M. Enzimele care au valori K_M cuprinse între 10^{-1}M şi 10^{-2}M prezintă o mică afinitate pentru substratele a căror transformare o catalizează; enzimele cu K_M cuprinse între 10^{-5}M — 10^{-8}M au o mare afinitate.

Valoarea K_M variază cu natura chimică a substratului, cu pH şi cu temperatura.

Pentru enzimele care catalizează reacţii bi- şi trimoleculare există o valoare K_M caracteristică pentru fiecare substrat.

Determinarea constantelor cinetice prin reprezentarea grafică a ecuaţiei Michaelis-Menten este anevoioasă atît datorită numărului mare de determinări experimentale necesare pentru trasarea graficului, cît şi a altor posibilităţi de erori. Lineweaver şi Burck prelucrează, matematic ecuaţia Michaelis-Menten în felul următor:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

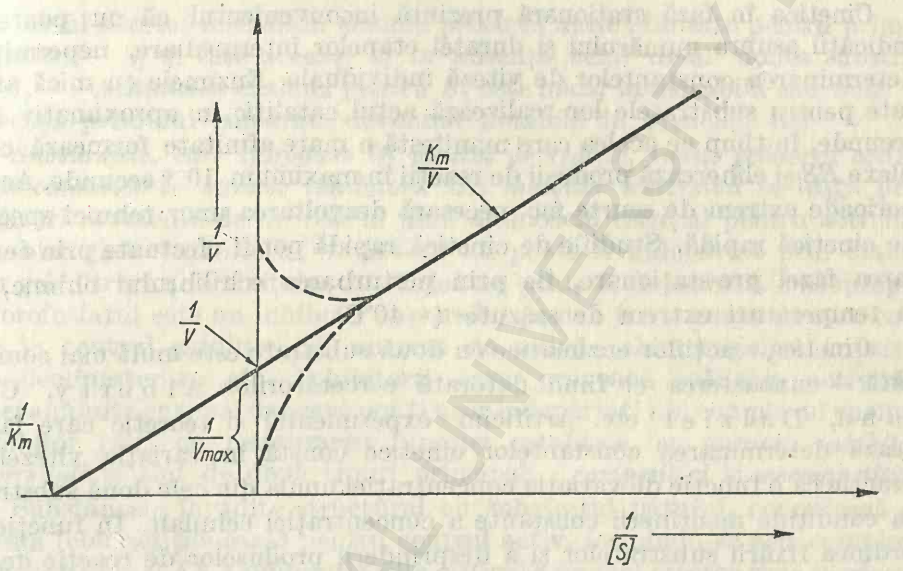


Fig. 6.22. — Variaţia vitezei de reacţie cu concentraţia substratului — reprezentarea Lineweaver-Burck.

Ecuaţia, într-un sistem de axe rectangulare cu $1/S$ pe abscisă şi $1/v$ pe ordonată, reprezintă o dreaptă (fig. 6.22) a cărei pantă este egală cu K_M/V_{max} şi care interceptează abscisa într-un punct egal cu $-1/K_M$. Prelucrarea Lineweaver-Burck are avantajul că necesită un număr mic de determinări experimentale (cel puţin trei).

În cazul reacţiilor enzimatice cu un singur substrat există şi posibilitatea formării a doi sau a mai multor complecşi intermediari enzimă-substrat ca în reacţia:

$$E + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES_1 \underset{k_4}{\overset{k_3}{\rightleftharpoons}} ES_2 \underset{k_6}{\overset{k_5}{\rightleftharpoons}} E + P$$

Ecuaţia Michaelis-Menten rămîne aplicabilă în condiţiile fazei staţionare cînd concentraţia fiecărui complex este constantă, adevăratul

complex Michaelis fiind cel care limitează viteza întregului proces enzimatic. Din punct de vedere termodinamic, numărul de intermediari nu modifică bilanțul energetic al reacției. Ecuația vitezei acestei reacții este:

$$v = \frac{(k_1 \cdot k_3 \cdot k_5 \cdot [S] - k_2 \cdot k_4 \cdot k_6 \cdot [P])\,[E_t]}{k_2 \cdot k_5 + k_2 \cdot k_4 + k_3 \cdot k_5 + k_1(k_3 + k_4 + k_5)\,[S] + k_6\,(k_2 + k_3 + k_4)\,[P]}$$

Dacă primul mecanism implică numai patru constante de viteză, cel de-la doilea implică șase — evaluarea lor fiind deosebit de dificilă.

Cinetica în fază staționară prezintă inconvenientul că nu poate da indicații asupra numărului și duratei etapelor intermediare, nepermițînd determinarea constantelor de viteză individuale. Enzimele cu mică afinitate pentru substratele lor realizează actul catalitic în aproximativ 10^{-1} secunde, în timp ce acelea care manifestă o mare afinitate formează complexe ES și eliberează produșii de reacții în maximum 10^{-6} secunde. Aceste perioade extrem de scurte fac necesară dezvoltarea unor tehnici speciale de cinetică rapidă. Studiile de cinetică rapidă pot fi efectuate prin cercetarea fazei pre-staționare, fie prin perturbarea echilibrului chimic, fie la temperaturi extrem de scăzute (—40°C).

Cinetica reacțiilor enzimatice cu două substrate este mult mai complicată — cunoașterea ei fiind datorată cercetătorilor Alberty, Cleland, Dalziel etc. Artificiul experimental și teoretic care facilitează determinarea constantelor cinetice constă în variația vitezei de reacție ca o funcție de variația concentrației unuia din cele două substrate, în condițiile menținerii constante a concentrației celulalt. În funcție de ordinea fixării substratelor și a desprinderii produselor de reacție deosebim trei tipuri de mecanisme:

— *mecanisme secvențiale* în care substratele se fixează la centrul activ al enzimei înaintea eliberării produșilor de reacție;

— *mecanisme ordonate* în care substratele se fixează la enzimă într-o ordine strictă;

— *mecanisme întîmplătoare (aleatorii)* în care substratele se fixează pe enzimă într-o ordine oarecare.

De exemplu, în mecanismul „Bi-Bi" ordonat, un substrat S_1 se fixează inițial la enzimă dînd un complex binar ES_1 la care se leagă cel de-al doilea substrat S_2 formînd un complex ternar ES_1S_2 care scindează mai întîi cu eliberarea produsului P_1, apoi a produsului P_2 și a enzimei, capabilă să participe la un nou ciclu catalitic.

$$\begin{array}{ccccccc} & \searrow S_1 & & \searrow S_2 & & \nearrow P_1 & \nearrow P_2 \\ E & & ES_1 & & (ES_1S_2 \rightarrow EP_1P_2) & & EP_2 & & E \end{array}$$

În cazul acestui mecanism se pot scrie reacţiile parţiale :

$$E + S_1 \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES_1$$

$$ES_1 + S_2 \underset{k_4}{\overset{k_3}{\rightleftharpoons}} ES_1S_2 \rightleftharpoons EP_1P_2 \underset{k_6}{\overset{k_5}{\rightleftharpoons}} EP_5 + P$$

$$EP_2 \underset{k_8}{\overset{k_7}{\rightleftharpoons}} E + P_2$$

În cazul acestui mecanism enzima prezintă mare afinitate pentru primul substrat — S_1 şi este aceeaşi şi în absenţa celui de-al doilea substrat — S_2 —. Afinitatea enzimei pentru S_2 este mică, insesizabilă sau nulă în absenţa primului substrat, devenind notabilă în prezenţa lui.

Substanţele, care introduse în mediul de reacţie, induc scăderea activităţii catalitice se numesc inhibitori. Un *inhibitor ireversibil* se leagă prin legături covalente de un rest al unui aminoacid esenţial pentru activitatea biologică. Inhibitorul ireversibil nu poate fi îndepărtat prin dializă sau gel-filtrare şi activitatea catalitică nu poate fi restaurată. Diizopropilfluorofosfatul este un inhibitor ireversibil pentru toate enzimele care conţin în centrul catalitic (şi) un rest de serină : chimotripsina, tripsina, acetilcolinesteraza etc. Inhibitorii care provoacă scăderea activităţii unei anumite enzime, dar care pot fi uşor îndepărtaţi din complexul enzimă-inhibitor (*EI*) cu restaurarea funcţiei catalitice, se numesc *inhibitori reversibili* şi sînt de două tipuri principale : *competitivi* şi *necompetitivi*.

Substanţele înrudite structural cu substratul natural, concurează cu acesta (competiţionează) pentru centrul activ, formîndu-se atît complecşi binari *EI* cît şi *ES*. Competiţia este cîştigată de acel efector care se găseşte în mediul de reacţie într-o concentraţie mai mare. În tabelul 6.3 sînt date exemple de inhibitori competitivi pentru tripsină şi chimotripsină. În cazul inhibiţiei competitive au loc următoarele reacţii :

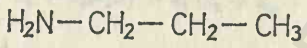
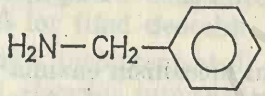
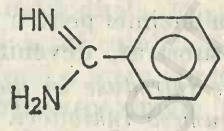
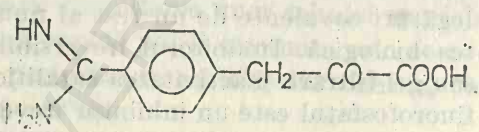
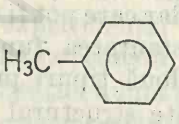
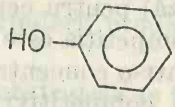
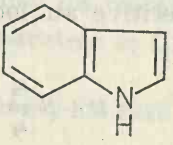
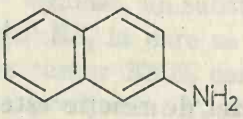
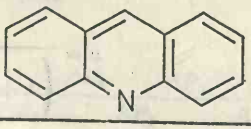
$$E + S \underset{k_1}{\overset{k_3}{\rightleftharpoons}} ES \underset{k_4}{\overset{k_5}{\rightleftharpoons}} E + P$$

$$E + I \underset{k_i}{\overset{k_i}{\rightleftharpoons}} EI,$$

iar ecuaţia vitezei de reacţie este dată de relaţia :

$$v = \frac{V_{max}\,[S]}{\left(1 + \frac{[I]}{k_i}\right)K_M + [S]}.$$

Inhibitori competitivi ai tripsinei și chimotripsinei

Denumirea inhibitorului	*Structura chimică*
I. *Inhibitorii competitivi ai tripsinei.*	
1-Propilamina	
Benzilamina	
Benzamidina	
Acid 4-amidinfenilpiruvic	
II. *Inhibitorii competitivi ai chimotripsinei*	
Toluol	
Fenol	
Indol	
3-Naftilamină	
Acridină	

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Această ultimă ecuație nu se deosebește de relația Michaelis-Menten decît prin termenul $\left(1 + \frac{[I]}{k_i}\right)$ cu care se înmulțește K_M. În cazul în care concentrația substratului în mediu este foarte mare și mult superioară valorii K_M $\left(1 + \frac{[I]}{k_i}\right)$, acest termen al ecuației poate fi neglijat și experimental se înregistrează o viteză egală cu cea existentă în absența agentului inhibitor. Prelucrînd Lineweaver-Burck ecuația vitezei reacției enzimatice în prezența unui inhibitor competitiv se obține relația :

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{max}}\left(1 + \frac{[I]}{k_i}\right)\cdot\frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}},$$

care reprezentată grafic (fig. 6.23) într-un sistem de axe rectangulare cu $1/S$ pe abscisă și $1/v$ pe ordonată se obține o dreaptă care intersectează abscisa într-un punct egal cu $-1/K'_M$, în care K'_M este constanta Michaelis modificată de prezența inhibitorului competitiv. Constanta Michaelis, în urma inhibiției competitive a unei enzime, crește, deci se înregistrează o scădere a afinității enzimei pentru substrat. Astfel, de exemplu, succinat dehidrogenaza care conține în calitate de coenzimă FAD și catalizează reacția :

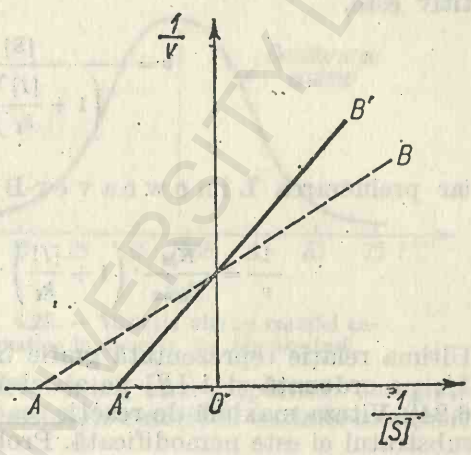
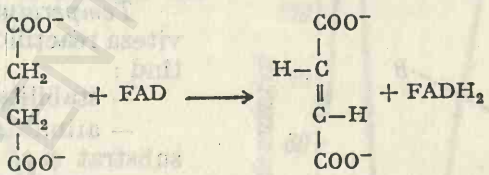


Fig. 6.23. — Reprezentarea Lineweaver-Burck a variației vitezei reacției enzimatice în prezența unui inhibitor competitiv. AB — reprezintă studiul acestei funcții în absența inhibitorului, iar $A'B'$ — în prezența inhibitorului, cînd este modificată valoarea constantei Michaelis-Menten.



Malonatul, $^-OOC-CH_2-COO^-$, un analog structural al succinatului se leagă la centrul activ al enzimei, dar nu este dehidrogenat, efectul inhibitor competitiv putînd fi exacerbat sau diminuat prin scăderea și respectiv creșterea concentrației în succinat.

Inhibiția necompetitivă se caracterizează prin aceea că efectul asupra activității catalitice a enzimei nu poate fi micșorat sau anulat prin mărirea

concentrației substratului, formîndu-se complecși *EI*, *ES* și *ESI*, conform reacțiilor :

$$E + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \underset{k_4}{\overset{k_3}{\rightleftharpoons}} E + P$$

$$E + I \rightleftharpoons EI$$

$$ES + I \rightleftharpoons ESI$$

Ecuația vitezei reacției enzimatice în prezența unui inhibitor necompetitiv este,

$$v = \frac{[S] \cdot V_{max}}{\left(1 + \frac{[I]}{k_i}\right)(K_M + [S])},$$

iar prelucrarea Lineweaver-Burck,

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \left(1 + \frac{[I]}{k_i}\right) \cdot \frac{1}{[S]} + \left(1 + \frac{[I]}{k_i}\right) \cdot \frac{1}{V_{max}}.$$

Ultima relație reprezentată grafic într-un sistem de axe rectangulare cu $1/v$ pe ordonată și $1/[S]$ pe abscisă permite obținerea unei drepte (fig. 6.24). Viteza maximă de reacție scade, dar valoarea K_M a enzimei pentru substratul ei este nemodificată. Probabil, inhibitorul se leagă la alt situs, inducînd modificări conformaționale care nu afectează activitatea enzimei pentru substrat, dar micșorează capacitatea catalitică.

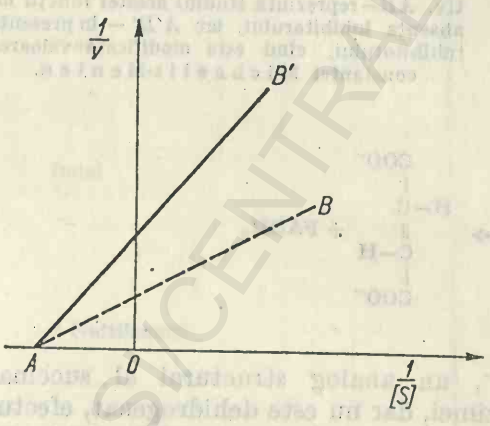


Fig. 6.24. — Reprezentarea Lineweaver-Burck a variației vitezei reacției enzimatice în prezența unui inhibitor necompetitiv. Dreapta *AB* reprezintă studiul acestei funcții în absența inhibitorului, iar dreapta *AB'* — în prezența lui, cînd este modificată valoarea V_{max}.

În afara tipurilor de inhibiție descrise, mai există și alte mecanisme prin care un efector scade eficiența unei enzime, mecanisme mai puțin reprezentate în cinetica enzimatică.

Temperatura influențează viteza reacțiilor enzimatice afectînd :

— stabilitatea enzimei ;

— afinitatea enzimei pentru substrat și

— viteza de scindare a complexului *ES*.

Efectul temperaturii asupra reacțiilor enzimatice este exprimat sub forma *coeficientului de temperatură* Q_{10} care reprezintă factorul de creștere a vitezei prin ridicarea temperaturii cu

10°C. Relaţia care face legătura între energia de activare E_a şi Q_{10} este următoarea :

$$E_a = \frac{RT^2 \lg Q_{10}}{10}.$$

Coeficienţii de temperatură ai reacţiilor enzimatice au valori cuprinse între 1 şi 2. La temperaturi relativ scăzute (5—40°C, de exemplu) viteza reacţiei enzimatice creşte proporţional cu creşterea temperaturii, atinge o valoare maximă într-un punct *(temperatură optimă de acţiune)* sau sub forma unui palier *(domeniu optim de temperatură)*, după care viteza scade datorită fenomenelor de denaturare termică (fig. 6.25). Majoritatea enzimelor prezintă o eficienţă catalitică maximă la 35—40°C, după care, la temperaturi mai mari, încep să se denatureze, la 60 — 70°C activitatea fiind foarte mică sau dispărînd complet.

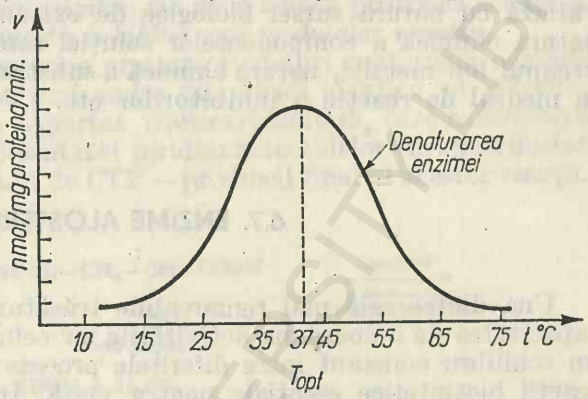
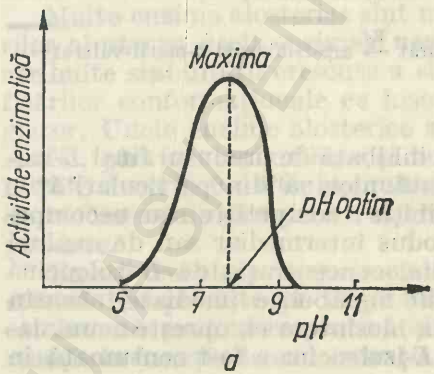


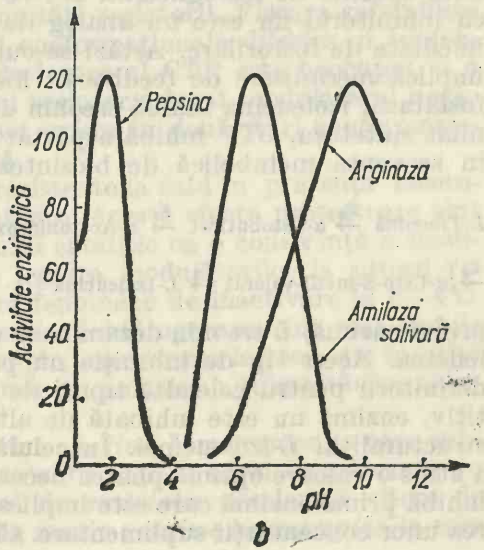
Fig. 6.25. — Variaţia vitezei reacţiei enzimatice în funcţie de temperatură.

Concentraţia ionilor de hidrogen în mediul de reacţie al enzimei modifică viteza procesului prin :

— schimbarea stării de ionizare a enzimei care este un polielectrolit, a substratului şi chiar a complexului *ES*, afectînd valoarea celor două constante cinetice : V_{max} şi K_M. Enzimele sînt active într-un domeniu

Fig. 6.26. — *a*— Reprezentarea schematică a variaţiei vitezei de reacţie în funcţie de *p*H ; *b* — *p*H optim de acţiune a trei enzime.



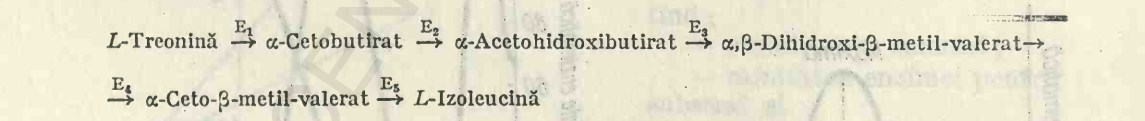


limitat al concentrației ionilor de hidrogen, în majoritatea cazurilor efectul catalitic fiind maxim la o anumită valoare numită *p*H *optim de acțiune* (fig. 6.26). Majoritatea enzimelor au o activitate optimă la *p*H 7—8 (transaminazele, tripsina, chimotripsina etc.), dar sînt și excepții ca pepsina și catepsinele, care acționează optim la *p*H 1,5 și respectiv *p*H 5, sau ca arginaza și ureaza, care au o capacitate catalitică maximă la *p*H 9—10.

Valoarea efectivă a *p*H optim de acțiune, pentru o anumită enzimă, variază cu natura sursei biologice de extracție a biocatalizatorului, cu natura chimică a componentelor soluției tampon, prezența sau absența vreunui ion metalic, natura chimică a substratului, prezența sau absența în mediul de reacție a inhibitorilor etc.

6.7. ENZIME ALOSTERICE

Una dintre cele mai remarcabile trăsături ale organismelor vii este capacitatea de a coordona activitățile lor celulare, așa încît să fie realizat un echilibru constant între diferitele procese catabolice și nenumăratele reacții biosintetice esențiale pentru viață. În ultimii 10 ani, biochimia a înregistrat mari succese în cunoașterea proceselor reglatorii, în înțelegerea funcțiilor lor metabolice, în special prin studierea enzimelor care catalizează reacții „cheie" în mecanismele de reglare. Mecanismul prin produsul final al unei secvențe metabolice inhibă, de cele mai multe ori, enzima care catalizează prima etapă a secvenței se numește *inhibiție prin feedback* sau *retroinhibiție*, și este sub control genetic. Fenomenul de inhibiție prin feedback a fost descoperit în 1940 de D i s c h e care a observat că fosforilarea glucozei, în hemolizatele de eritrocite, este inhibată specific de fosfoglicerat. D i s c h e recunoaște importanța faptului că inhibitorul nu este un analog de substrat, nici un produs al reacției imediate de fosforilare. Astăzi se cunosc mai multe căi biosintetice care implică mecanisme de feedback : histidina inhibă fosforibozil-ATP-pirofosfataza, izoleucina inhibă treonin dezaminaza, triptofanul inhibă antranilat sintetaza, CTP inhibă aspartat transcarbamilaza etc. De exemplu, în secvența metabolică de biosinteză a *L*-izoleucinei,



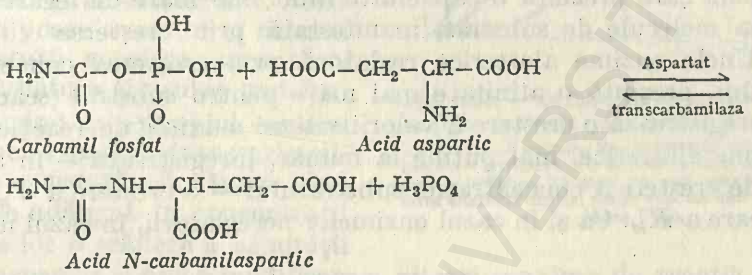
prima enzimă, *L*-treonin dezaminaza este inhibată de produsul final *L*-izoleucina. Acest tip de inhibiție nu prezintă niciuna din particularitățile definitorii pentru celelalte tipuri de inhibiție : competitiv sau necompetitiv, enzima nu este inhibată de alt produs intermediar sau de analogi structurali ai *L*-izoleucinei. În celulă, cînd concentrația de *L*-izoleucină a atins o valoare optimă pentru necesitățile metabolice imediate, aceasta inhibă prima enzimă care este implicată în biosinteza ei, oprește acumularea unor concentrații suplimentare. Cînd *L*-izoleucina a fost consumată în

alte căi metabolice şi concentraţia acestui aminoacid a scăzut sub valoarea optimă, este „ridicată" retroinhibiţia şi biosinteza reîncepe.

Aceste enzime care suferă acest tip special de inhibiţie se numesc *enzime reglatorii* sau *enzime alosterice.*

Caracteristica esenţială a enzimelor alosterice este susceptibilitatea lor de a fi activate sau inhibate de alţi metaboliţi decît substratele naturale. Aceşti metaboliţi se numesc *efectori alosterici* sau *modulatori alosterici.* Dacă modulatorul induce creşterea capacităţii catalitice a enzimei se numeşte *activator* sau *modulator pozitiv,* iar dacă acesta provoacă scăderea eficienţei ei catalitice se numeşte *inhibitor* sau *modulator negativ.*

Majoritatea enzimelor alosterice prezintă structuri cuaternare complicate, constituite din două sau mai multe subunităţi identice sau diferite. Astfel, de exemplu, enzima aspartat transcarbamilaza, care catalizează prima reacţie în secvenţa biosintezei piridinnucleotidelor (uridintrifosfat şi citidintrifosfat), este inhibată de CTP — produsul final al acestor reacţii.



Carbamil fosfat *Acid aspartic*

Acid N-carbamilaspartic

Enzima izolată din *E. coli* are o masă moleculară de 300 000 daltoni şi o structură oligomeră. Sub acţiunea sărurilor mercurice enzima disociază în două clase de subunităţi : una care conţine activitate catalitică, dar nu este inhibată de CTP — numită *subunitate catalitică* — şi cealaltă, fără activitate catalitică, dar cu capacitatea de a lega CTP, a fost denumită *subunitate reglatorie.* Se pare că, într-o moleculă de enzimă există şase subunităţi catalitice şi şase subunităţi reglatorii. Fiecare subunitate reglatorie poate exista în două stări conformaţionale diferite, o conformaţie neinhibitoare în care situsul de legare al CTP este neocupat şi o conformaţie inhibitoare în care situsul reglator a legat modulatorul negativ. Similar, subunităţile catalitice pot exista în două stări conformaţionale, una activă şi cealaltă inhibată.

Multe enzime alosterice sînt mai rezistente la cald în prezenţa efectorilor alosterici decît enzimele nereglatoare. Aceste efecte protectoare sînt atribuite stabilităţii crescute a situsului catalitic ca o consecinţă a modificărilor conformaţionale ce însoţesc legarea modulatorilor la situsul reglator. Unele enzime alosterice suferă fenomene de inactivare la 0—4°C. Astfel, piruvat carboxilaza şi homoserin dehidrogenaza sînt mai stabile la 25°C decît la 0—4°C. În multe exemple, inactivarea la rece este însoţită de fenomene de disociere a enzimei sau de asociere a subunităţilor componente.

Există trei clase de enzime alosterice : *enzime homotropice,* la care substratul îndeplineşte pe lîngă rolul de substanţă a cărei transformare o catalizează enzima respectivă şi rolul de *modulator* accelerînd viteza de reacţie în funcţie de concentraţia lui în mediu ; *enzime heterotropice,* la care

cinetica este afectată de prezența unei substanțe efector sau modulator, alta decît substratul natural și *enzime homotropic-heterotropice*, care sînt enzime reglatorii multivalente cu proprietăți mixte, în care substratul este unul dintre modulatorii enzimei. Enzimele homotropice conțin cel puțin două situsuri de legare pentru substrat, dintre care cel puțin unul este un *situs catalitic*, celălalt fiind un *situs reglator*. Enzimele heterotropice posedă un situs catalitic la care se leagă substratul și un *situs alosteric reglator* la care se leagă *efectorul alosteric*.

Majoritatea enzimelor alosterice prezintă abateri de la cinetica michaeliană, manifestate mai ales în studiul variației vitezei de reacție cu concentrația substratului. În cazul *enzimelor homotropice* curbele de saturare în substrat pierd aspectul hiperbolic caracteristic enzimelor normale, fără funcții reglatorii, și devin sigmoide (fig. 6.27, *a*). Legarea primei molecule de substrat induce în structura enzimei alosterice o modificare conformațională care prezintă o capacitate mult mai mare de legare a celei de a doua molecule de substrat, manifestată prin creșterea vitezei de reacție. Unele enzime alosterice reglatorii prin creșterea concentrației substratului, prezintă o afinitate mai mare pentru substrat (scade K_M). dar nu înregistrează o creștere a valorii vitezei maxime de reacție, V_{max}. Alte enzime alosterice, mai puține la număr, înregistrează — în aceleași condiții de creștere a concentrației substratului — o creștere a V_{max} fără o modificare a K_M. Ca și în cazul enzimelor nereglatorii, în cazul unor en-

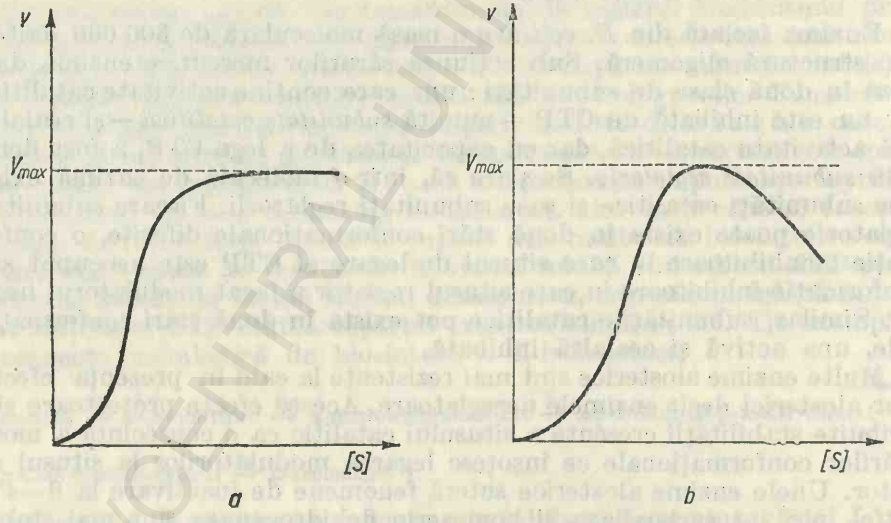


Fig. 6.27. — Curbele de saturație în substrat la enzimele alosterice homotropice:
a — cazul în care legarea unei molecule de substrat facilitează legarea următoarelor molecule și *b* — cazul în care au loc fenomene de inhibiție la concentrații mari de substrat.

zime alosterice se înregistrează, la concentrații mari de substrat, inhibarea capacității catalitice (fig. 6.27, *b*). În cazul *enzimelor heterotropice* curbele care redau variația vitezei de reacție cu creșterea concentrației substra-

tului în mediu au tot un aspect sigmoid (fig. 6.28), inhibiţia sau activarea în prezenţa unui efector alosteric afectînd fie valoarea lui K_M, fie valoarea lui V_{max}. În prezenţa unui modulator pozitiv se obţin curbe situate deasupra curbei care redă viteza normală, iar în prezenţa unui efector negativ se obţin curbe situate sub curba construită din datele unui experiment normal.

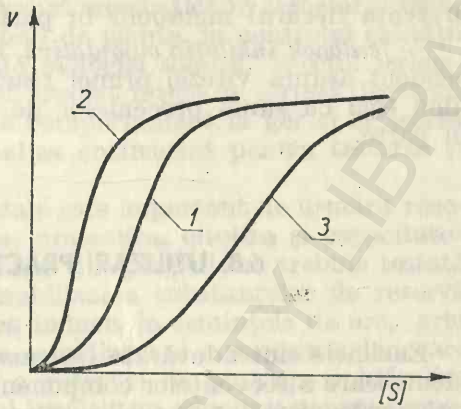


Fig. 6.28. — Curbele de saturaţie în substrat la enzimele alosterice heterotropice:
1 — în condiţii normale; 2 — în prezenţa unui modulator-pozitiv — activator; 3 — în prezenţa unui modulator negativ — inhibitor. Efectorul provoacă creşterea sau scăderea afinităţii enzimei pentru substrat fără a afecta valoarea V_{max}.

Prin tratarea unei enzime alosterice cu un reactiv care produce modificări chimice selective la nivelul situsului reglator are loc dispariţia capacităţii de a fi activată sau inhibată de modulatorii respectivi (pozitivi sau negativi), — fenomen numit *desensibilizare*. Acest fenomen poate avea loc şi natural prin mutaţii genetice care afectează structura situsului reglator.

Revenind la exemplul enzimei alosterice, aspartat transcarbamilaza, se constată că atunci cînd CTP este adăugat în concentraţii mari are loc o scădere a afinităţii pentru aspartat şi nici o modificare a vitezei maxime de reacţie. Cînd se adaugă ATP, acesta „competiţionează" cu CTP pentru acelaşi situs al enzimei, un situs reglator. Cînd situsul reglator al enzimei este ocupat de CTP legarea substratului este îngreunată şi reacţia inhibată, în timp ce dacă acest situs este ocupat de ATP reacţia este stimulată. Deci CTP este un modulator negativ şi ATP este un modulator pozitiv.

Sărurile mercurice desensibilizează enzima inducînd creşterea afinităţii pentru aspartat, dispariţia aspectului sigmoid al curbei de saturare în substrat şi respectarea cineticii michaeliene.

CTP inhibă reacţia enzimatică numai cînd subunităţile reglatorii şi catalitice sînt asamblate în cadrul structurii cuaternare native.

În cazul căilor biosintetice ramificate, ca de exemplu :

$$S_1 \rightarrow S_2 \rightarrow S_3 \rightarrow S_4 \begin{matrix} \nearrow S_5 \\ \rightarrow S_6 \\ \searrow S_7 \end{matrix}$$

sînt recunoscute cel puţin patru feluri de control prin mecanisme de feedback :

— mecanismul *de elaborare a unor forme moleculare* ale unei enzime care să fie capabilă de a cataliza prima reacţie enzimatică dintr-o secvenţă metabolică ramificată, fiecare fiind susceptibilă de a fi inhibată de alt produs final ;

— *inhibiţia multivalentă* în care toţi produşii finali ai unei căi biosintetice ramificate trebuie să fie prezenţi în cantităţi excesive pentru a inhiba prima enzimă a secvenţei ;

— *feedback inhibiția cooperativă*, în care un exces al unuia din produșii finali cauzează o inhibiție parțială a primei etape enzimatice, în timp ce excesul simultan al tuturor produșilor de reacție are ca rezultat o inhibiție mai mare decît suma inhibițiilor fracționale, înregistrată în prezența fiecărui metabolit în parte;

— *feedback inhibiția cumulativă*, în care produșii finali acționează independent asupra vitezei primei reacții enzimatice, procentul de inhibiție fiind egal cu suma procentelor de inhibiție înregistrate în fiecare caz în parte.

6.8. UTILIZĂRI PRACTICE ALE ENZIMELOR

Enzimele sînt adevărate *instrumente de cercetare a metabolismului*, de identificare a secvențelor componente ale unei căi metabolice, de cunoaștere a mecanismelor de reglare și control care îi sînt caracteristice. Separarea și caracterizarea unei enzime permite obținerea de informații asupra transformărilor posibile pe care le poate suferi un metabolit, la un moment dat, în funcție de necesitățile celulei, a corelației cu alte substanțe din care se formează sau la biosinteza cărora ia parte.

În medicină concentrațiile metaboliților și enzimelor din țesuturile și lichidele corpului pot servi ca indicatori pentru starea metabolică. De exemplu, activitatea unor enzime din plasmă (protrombina, plasminogenul, ceruloplasmina etc.) scade atunci cînd organele în care a avut loc biosinteza lor au fost lezate. Determinarea activității enzimelor „secretate" (α-amilaza pancreatică, α-amilaza din paratiroidă, fosfataza din prostată) permite utilizarea lor în diagnoza clinică a maladiilor care au afectat organul sau țesutul care le „secretă". De asemenea, pot fi utilizate în același scop „enzimele celulare" (LDH, MDH, GPT, GOT) care includ enzimele metabolismului celular și „enzimele specifice de organ" care includ enzimele intim asociate cu un organ particular (pentru ficat: enzimele ciclului ureei, glucozo-6-fosfat dehidrogenaza etc., pentru țesutul osos: fosfataza alcalină etc.).

Creșterea activității unei enzime în ser este datorată distrugerii celulelor unui organ. Studii pe animale au indicat o bună corelație între creșterea activității enzimelor individuale în ser și doza unei toxine, concentrația și virulența unui virus inoculat, iar studiile clinice au indicat o bună corelație între severitatea bolii și gradul modificărilor enzimatice din ser.

În chimia alimentară, termolabilitatea enzimelor a fost utilizată pentru a investiga timpul necesar proceselor de sterilizare sau pasteurizare a diferitelor alimente. Măsurarea activității enzimatice continuu în cursul tratamentului, păstrării și maturării alimentului poate da indicații asupra biodinamicii alimentului. Astfel, de exemplu, fosfatazele, peroxidazele, amilazele sînt enzime utilizate în industria laptelui pentru testarea procesului de pasteurizare a acestuia; activitatea amilazică este un test al calității făinii, mierii de albine, activitatea GOT permite diferențierea între carnea proaspătă și carnea supusă unor tratamente de îngheț/dezgheț

etc. Enzimele, în chimia alimentară, sînt întrebuinţate şi la dozarea unor constituenţi din alimente: acid lactic, acid malic, glicerină, acid tartric, zaharuri etc.

Botanica şi chimia agricolă aplică analiza enzimatică în cercetarea fiziologiei plantelor, a metabolismului în boli de plante, în controlul calităţii unor produse vegetale, în cercetări ale biologiei solului. Efectul ierbicidelor şi promotorilor de creştere a fost studiat intens în strînsă legătură cu activităţile unor enzime. Studii de comportament la ger şi la secetă a unor plante de cultură practică analiza enzimatică pentru testarea şi alegerea soiurilor rezistente.

În cursul păstrării produselor vegetale este important de urmărit reacţiile enzimatice catabolice — amiloliza, proteoliza, citoliza şi capacitatea oxidativă. Calitatea seminţelor germinate şi a plantulelor trebuie testată prin reacţii endergonice, legate de mobilizarea substanţelor de rezervă care afectează germinarea. Germinarea induce, la seminţele de orz, grîu etc. o creştere spontană în activitatea α-amilazei şi a proteinazelor, care are ca rezultat scindarea hidrolitică a rezervei de amidon şi hidroliza parţială a proteinelor de rezervă. Grîul încolţit nu este bun pentru prepararea făinei, în timp ce orzul încolţit este sursa ideală pentru obţinerea malţului în vederea fabricării berii. Rîncezirea făinii sau a cerealelor zdrobite, ca şi a seminţelor oleaginoase este datorată în parte activităţii crescute a lipazelor şi lipooxigenazelor în timpul depozitării defectuoase a materialului.

Enzimele îşi găsesc o largă aplicabilitate şi în *microbiologie*. Microorganismele sînt crescute pe anumite medii de cultură încît pot produce cantităţi mari dintr-o gamă foarte variată de substanţe organice. Introducerea în mediul de cultură a unui substrat induce biosinteza enzimei care catalizează transformarea lui. De exemplu, *Candida mycoderma* crescută pe un mediu ce conţine glicerină, poate servi ca sursă de izolare a *glicerokinazei*. Cînd concentraţia de glicerină din mediul de cultură scade, miceliul „fabrică" atît de puţină glicerokinază, încît sursa biologică devine inutilizabilă pentru separarea enzimei.

Enzimele proteolitice sînt întrebuinţate la prepararea mediilor microbiologice de cultură datorită proprietăţilor lor de a „digera" diferite surse proteice (carnea de peşte, diferite resturi de la abator etc.).

În industria chimică enzimele sînt utilizate atît ca reactivi chimici de analiză cît şi ca reactivi chimici de sinteză. În domeniul chimiei proteinelor, astăzi nu se poate concepe studiul secvenţei de aminoacizi a unei proteine fără utilizarea metodelor de hidroliză enzimatică cu proteinaze (*pepsină*, *tripsină*, *chimotripsină*, *papaină*) descrise de F. S a n g e r, care reprezintă un adevărat model de cercetare a structurii primare. Această cercetare, încununată cu succes în cazul insulinei — cea mai mică proteină cunoscută — a adus autorului premiul Nobel pentru chimie în anul 1958.

În chimia preparativă, în ultimul timp enzimele şi-au găsit o largă aplicare. Astfel, diferitele transferaze permit grefarea de diferite grupări pe compuşi organici conducînd la substanţe noi care prin metode chimice clasice de sinteză erau obţinute greu şi în stare impură, izomerazele permit izolarea unui izomer optic de enantiomerul lui — sînt enzime care catalizează transformarea unui singur izomer optic dintr-un amestec racemic permiţînd obţinerea celuilalt într-o stare de înaltă puritate etc.

Locul detergenţilor chimici este din ce în ce mai mult preluat de detergenţii biologici, superiori prin acţiunea lor de înmuiere şi spălare, în constituţia cărora intră enzime de tipul *lipazei* („digeră" grăsimile), *proteinazelor* („digeră" proteinele), *amilazelor* („digeră" zaharurile).

Rennina este o enzimă proteolitică, utilizată în industria alimentară, în procesul de fabricaţie a brînzeturilor prin coagularea laptelui, iar *lipaza* este folosită ca emulgator natural în industria panificaţiei. *Pectinazele* sînt utilizate în limpezirea vinurilor şi altor băuturi alcoolice.

În *industria medico-farmaceutică* enzimele sînt deja de foarte mult timp utilizate. *Pepsina*, enzimă izolată din peretele stomacal şi din sucul gastric, în stare de înaltă puritate, este utilizată în tratarea unor maladii gastrice, iar un amestec de *proteinaze*, *amilază*, *lipază*, *celulaze* intră în constituţia unor medicamente indicate în dispepsiile datorate digerării defectuoase a alimentelor. *Celulazele* din diferitele preparate farmaceutice diminuează acţiunea iritantă a polizaharidelor insolubile asupra mucoasei intestinale, împiedică efectele de meteorism şi asigură o bună asimilare a alimentelor ingerate. Un amestec de *hialuronidază* şi *lizozim* reprezintă principala componentă a unui unguent indicat pentru cicatrizarea rapidă a rănilor, iar *hialuronidaza* intră în constituţia a nenumărate medicamente ca adjuvant în mărirea permeabilităţii celulare.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITARĂ

7

ALTE PROTEINE FUNCȚIONALE

7.1. GLICOPROTEINE

Complexele glicoproteice au fost cunoscute timp îndelungat sub cele mai diverse denumiri — *mucoproteine, mucoide, mucine, glicoproteine* etc. și au fost studiate din punct de vedere chimic pentru prima dată de B o s t o c k (1805). Istoria agitată a dezvoltării cercetărilor în domeniul biochimiei glicoproteinelor este expusă magistral de G o t t s c h a l k (1972) într-un studiu istoric deosebit de instructiv. Prima clasificare a glicoproteinelor elaborată de către L e v e n e (1925) pe baza compoziției chimice a părții lor glucidice, a fost urmată de alte numeroase clasificări, determinate de aprofundarea permanentă a cunoașterii structurii chimice a acestei clase de substanțe.

G o t t s c h a l k (1972[b]) definește glicoproteinele drept *„proteine conjugate care conțin ca grupare (i) prostetică (e) una sau mai multe heteroglucide alcătuite dintr-un număr relativ mic de resturi de glucide, de regulă ramificate, lipsite de o unitate care se repetă regulat și legate covalent la o catenă polipeptidică"*. Partea glucidică poate varia în limite extrem de largi, constitue între 1 și 70 % din masa moleculară a glicoproteinelor și este predominantă în unele cazuri, de exemplu, în glicoproteinele cu activitate de grup sanguin. În compoziția glicoproteinelor se întîlnesc *oze*: — *D*-galactoza, *D*-manoza, *L*-fucoza; *ozamine*: 2-amino, 2-deoxiglucoza sau *D*-glucozamina, 2-amino-2-deoxigalactoza sau galactozamina prezente de regulă sub formă de *derivați N-acetilați*, precum și unul sau mai mulți *derivați ai acidului neuraminic*, de exemplu, acidul N-acetilneuraminic: din glicoproteinele serice umane (fig. 7.1).

Glicoproteinele sînt răspîndite în toată lumea animală, la plantele verzi și în fungi, ceea ce reliefează o dată în plus importanța lor pentru organismele vii. Ele sînt secretate practic de toate celulele și parțial sînt

reținute în celulă intrînd în structura particulelor subcelulare iar în cea mai mare parte sînt eliminate în spațiul extracelular (proteine extracelulare) unde îndeplinesc funcții speciale. Din această subclasă de proteine-

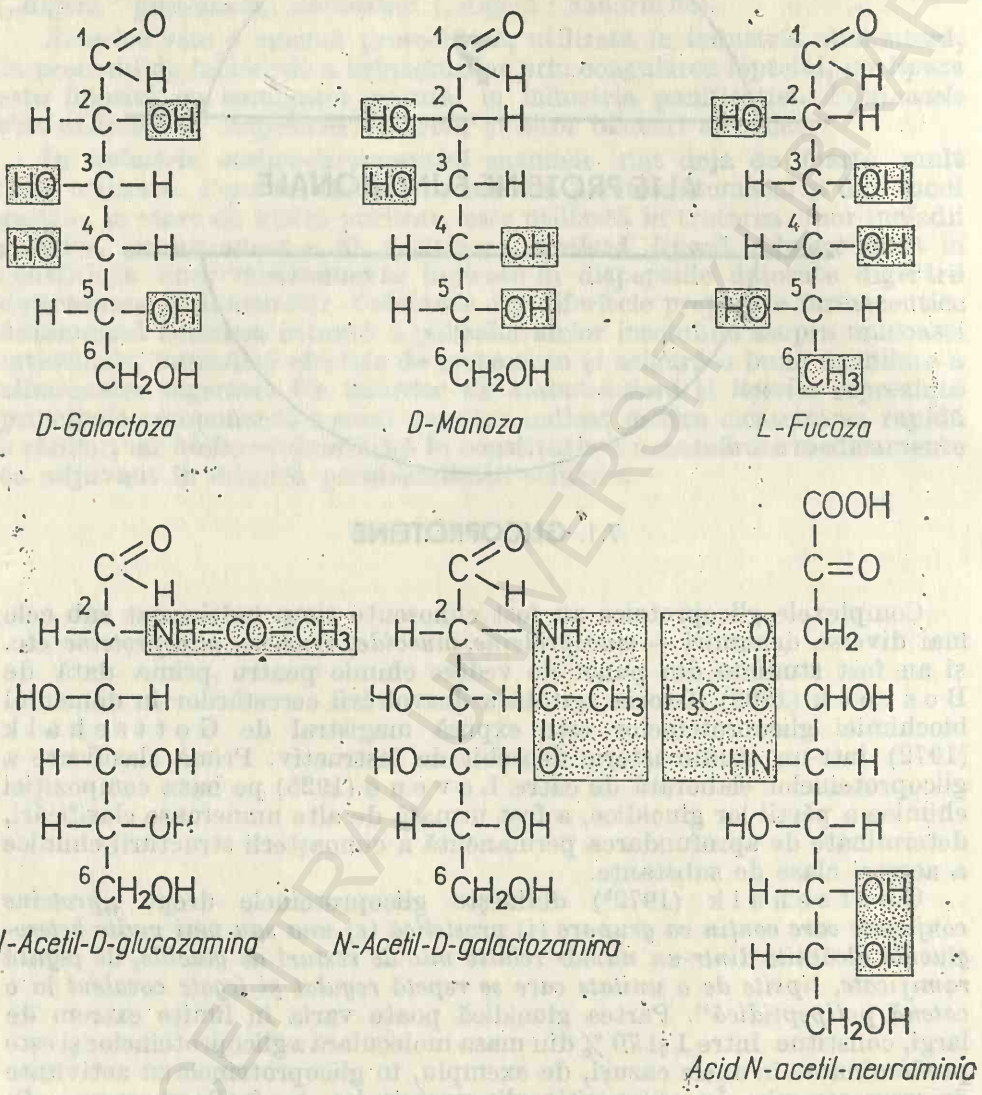


Fig. 7.1. — Principalele oze, ozamine și derivați ai acidului neuraminic prezenți în glicoproteide.

conjugate fac parte glicoproteinele plasmatice, imunoglobulinele, tiroglobulinele, unii hormoni gonadotropi, enzimele de natură glicoproteică (glucozooxidaza, peroxidaza, ribonucleaza, lipaza, α- și β-amilaza, unele proteinaze etc.) glicoproteinele țesutului conjunctiv, proteoglicanii și peptidoglicanii, transferinele, ceruloplasmina, haptoglobine, fetuina, α_2-macroglobulinele, α_1-acid glicoproteinele și altele (tabelul 7.1).

Principalele tipuri de glicoproteide și clasificarea lor sumară după structură, activitate și distribuție în lumea animală

Denumirea glicoproteinelor	*Principalii reprezentanți*	*Locul de elaborare, de stocare sau de identificare*	*Rolul fiziologic sau biochimic indeplinit de glicoproteine****
1. Glicoproteine plasmatice *	α-Glicoproteine acide, α_2-macroglobuline, α_2-glicoproteine, protrombina, fibrinogenul, γ-globuline (7*S* și 19*S*), fetuina, haptoglobuline, ceruloplasmina, transferina		Anticorpi Enzime Proteine de transport
2. Glicoproteinele țesutului conjunctiv	Colagen, reticulina, cristalin, glicoproteine solubile		
3. Glicoproteine cu activitate de grup sanguin		Hematii, salivă, suc gastric, chisti ovarieni, urină etc.	
4. Glicoproteine cu activitate hormonală sau înrudite cu hormonii **	ICSH, FSH, eritropoietina, TSH, gonadotropina corionică, tiroglobulina		Hormoni
5. Glicoproteine prezente în secrețiile diferitelor mucoase și glande		Secreții traheobranchiale, biliare, gastrice; glande submaxilare, sublinguale, cervicale	
6. Glicoproteinele din albușul de ou	Ovomucina, ovomucoidul, avidina, ovalbumina		
7. Glicoproteine urinare	Glicoproteina lui Tam și Horsfall		
8. Glicoproteine vegetale	Fitohemaglutinine, enzime, componente al peretelui celular, glicoproteina II etc.		

* Unele probleme privind chimia și biochimia glicoproteinelor din această categorie, au fost expuse pe larg în text dat fiind implicațiile teoretice și importanța lor practică.

** Hormonii de natură glicoproteică sînt descriși pe larg și structura lor chimică este analizată în capitolul 7.1.6.

*** În această rubrică sînt enunțate numai unele aspecte ale rolului fiziologic și biochimic al glicoproteinelor. Textul conține informații mai ample despre glicoproteinele descrise.

Locul secreției și eliminării glicoproteinelor la mamifere este extrem de diversificat și multiplu sub raport structural și funcțional — mucoasa gastrică, sucurile gastric și duodenal, bilă, lichid amniotic, secreții vaginale, secreții ale glandelor submaxilare, ectoderma, mezenchimul țesutului conjunctiv, plasma seminală, bronhii, oviduct, glandă mamară, ficat, pancreas, placentă, hipofiză, tiroidă etc. — iar funcțiile lor deosebit de variate — protejarea suprafețelor care vin în contact direct cu mediul ambiant, lubrifianți, hormoni, enzime, factori de coagulare ai sîngelui, constituenți structurali ai membranelor celulare, substanțe transportoare și participante la asigurarea imunității organismului față de diferiți agenți patogeni, substanțe de rezervă (*k*-cazeina, glicoproteinele endospermului, ovalbumina, ovomucoidul) etc.

Glicoproteinele au fost mai puțin studiate la pești și la nevertebrate, dar cercetările din ultimii zece ani au arătat prezența lor la numeroase specii fie sub formă de mucusuri, cu o compoziție chimică similară cu a secreților epiteliale ale vertebratelor, fie ca glicoproteine structurale prezente în stilul cristalin de la *Mya arenaria* și *Cardium edule*, ca enzime la *Helix pomatia* sau ca substanțe de apărare, de exemplu, la artropodul *Dytiscus marginalis*.

În regnul vegetal glicoproteinele pot fi întîlnite ca fitohemaglutinine, enzime, componente ale peretelui celular sau proteine cu puternice proprietăți antigenice, de exemplu, glicoproteina II izolată din *Phaeseolus vulgaris*.

7.1.1 Ceruloplasmina

Este o glicoproteină plasmatică care conține aproximativ 95% din cuprul plasmatic sub formă legată (8 atomi de Cu la mol de proteină), are o masă moleculară de aproximativ 132 000—160 000 daltoni și este deosebit de stabilă la temperatură, dar purificarea ei prin cromatografie pe coloane sau conservarea ei sînt însoțite uneori de modificări imunologice și structurale. Cuprul este legat ireversibil în ceruloplasmină de către ficat (în mitocondrii) iar *in vivo* nu poate fi schimbat cu cuprul liber (Jamieson, 1972). Din punct de vedere genetic ceruloplasmina este o proteină polimorfă și după mobilitatea electroforetică au fost detectate la aceeași familie umană trei tipuri CpA, CpB, și CpC controlate genetic de trei alele codominante CpA, CpB și CpC. Reducerea, alchilarea, separarea electroforetică și gel filtrarea ceruloplasmei umane au condus la concluzia că această glicoproteidă are structura unui octomer ($\alpha_2\beta_2\gamma_2\delta_2$ — Poulik, 1968) sau ($\alpha_4\beta_4$ — Carrico, 1968). Catenele α au o masă moleculară de 15 900 și în poziția N-terminală un rest de valină, iar catenele β — 58 900, iar în poziția N-terminală un rest de lizină. Componenta glucidică a ceruloplasminei conține galactoză, manoză, glucozamină, fucoză și acid sialic, avînd o masă moleculară ce variază între 1 100—1 900 daltoni, ceea ce înseamnă că la o moleculă de ceruloplasmină cu o masă moleculară de 160 000, sînt prezente 10 catene heteroglucidice unite cu componenta proteică prin intermediul restului de fucoză la un rest de asparagină (Jamieson, 1972).

Ceruloplasmina are proprietăţi catalitice posedînd activitate polifenoloxidazică şi poliaminoxidazică; ea poate oxida direct substratul, de exemplu în cazul Fe^{2+}, pe care-l oxidează la ion Fe^{3+} reacţie ce precede încorporarea acestuia în apotransferine, sau în cazul polifenolilor şi diaminelor aromatice, cînd viteza reacţiei de oxidare este accelerată de reacţia de cuplare ceruloplasmină—Fe^{2+}. În alte cazuri, de exemplu, oxidarea acidului ascorbic, dihidroxifenilalaninei, poliaminelor etc., ceruloplasmina este activă numai în prezenţa acestei reacţii de cuplare ceruloplasmina—Fe^{2+}.

Rolul ceruloplasminei în organism poate fi indirect presupus pe baza datelor privind dereglarea metabolismului ionului de fier şi biosintezei hemoglobinei în absenţa cuprului. Se presupune că ceruloplasmina mediază eliberarea fierului din celulele parenchimale ale ficatului, din sistemul reticulo-endotelial şi din mucoasa duodenală.

7.1.2 Transferinele

Sînt glicoproteine plasmatice, denumite şi siderofiline sau β_1-globuline, care conţin fier. În prezent sînt bine caracterizate din punct de vedere biochimic *transferinele plasmatice, ovotransferina* * izolată din albuşul de ou al diferitelor specii de păsări şi *lactotransferinele*, izolate din lapte, transferinele izolate din saliva umană, bilă, suc pancreatic, lichid seminal, secreţii nazale, urină etc.

Masa moleculară a transferinelor şi lactotransferinelor este în medie de 76 000 daltoni şi capacitatea lor de a lega fierul variază între 1,47 şi 1,51 μg Fe/mg proteină. Transferinele izolate din serul de şoarece şi din serul de porc au mase moleculare de 68 000 şi respectiv 82 000. Fiecare moleculă a transferinelor conţine sub formă legată 2 atomi de fier (S u t t o n, 1972) şi este alcătuită dintr-o singură catenă polipeptidică cu o masă moleculară de aproximativ 77 000 daltoni; conţine galactoză şi manoză într-o proporţie de 2/1, N-acetilglucozamină şi acid N-acetilneuraminic. Conţinutul procentual al componentei glucidice este de 5,8% în transferine şi 7,0% în lactotransferine, acestea conţinînd în plus şi fucoză.

La unele organisme animale, de exemplu la *Ertatretus stoutii, Pseudemys scripta,* transferinele au mase moleculare de 45 000 şi respectiv 92 000 (la ultima specie fiind prezente sub formă de dimer) dar cu o capacitate mai mică de legare a Fe-1 μg Fe/mg proteină, ceea ce denotă o formă moleculară mai primitivă.

Modalitatea de legare a componentei glucidice de catena polipeptidică pare să fie diferită în funcţie de sursa de izolare a transferinelor: în transferina umană restul N-acetiloglucozaminic se leagă prin intermediul grupării lui semiacetalice cu gruparea amidă a asparaginei, în timp ce în transferinele din plasma bovinelor componenta glucidică se poate lega atît de restul de asparagină cît şi de cel de serină. în lactotransferinele umane componenta glucidică este legată de cea proteică prin două feluri de legături, treonină-manoză şi acid aspartic-glucozamină (S p i k şi a l ţ i i, 1965 a, b, 1966 a, b, 1968, 1969).

Hidroliza transferinei umane cu ajutorul tripsinei pune în libertate două glicopeptide-glicopeptida *A* care în locul ei de legare la catena poli-

* Ovotransferina este cunoscută şi sub numele de conalbumină.

peptidică are în vecinătate o secvență — Gly—Ser —Asn— și glicopeptida *B* legată la catena polipeptidică în vecinătatea unei secvențe —Cys—Asx—Asn—Lys, ambele fiind unite cu componenta proteică prin intermediul unui rest de asparagină (C h a r e t și a l ț i i 1969). Doi ani mai tîrziu J a m i e s o n și a l ț i i (1971) confirmă existența celor două glicopeptide în cazul transferinei umane, una unită în componenta proteică printr-un rest de asparagină, iar cealaltă prin intermediul unui rest de glicină, serină, asparagină și numai ocazional printr-un rest de treonină *. Ultimii autori demonstrează, de asemenea, că cele două catene glucidice sînt identice și au structura menționată la figura 7.2.

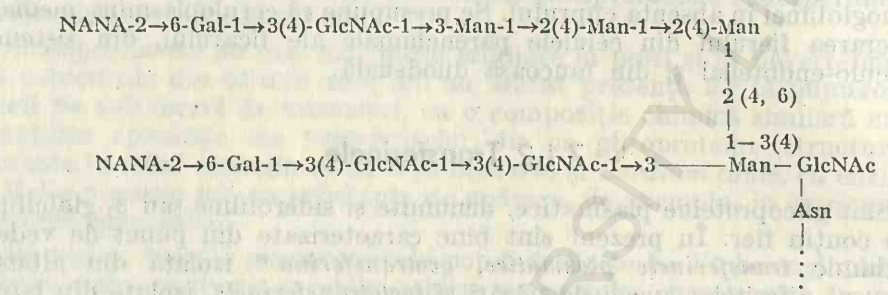


Fig. 7.2. — Structura părții glucidice din transferina umană.

Transferinele leagă fierul în stare ionică Fe^{3+} mai degrabă decît sub formă bivalentă; ele sînt capabile să lege și Cu^{2+} dar cu o afinitate mult inferioară celei manifestate pentru ionii de Fe^{3+}; Cr, Co, Mn pot fi, de asemenea, legați, iar soluțiile de citrat și bicarbonat favorizează formarea complexelor. Este unanimă opinia conform căreia în legarea ionilor de Fe^{3+} și Cu^{2+} sînt implicate trei resturi de tirozină pentru fiecare atom de Fe^{3+} și două resturi de tirozină și cîte două resturi de histidină pentru fiecare atom de Cu^{2+} (A a s a și a l ț i i, 1968).

Transferinele plasmatice funcționează în organismele animale ca transportori ai fierului de la locul acestuia de eliberare către țesuturile care au nevoie de Fe. Legarea ionului de fier este un proces reversibil, energodependent, care la *p*H 6,5—7 decurge în sensul formării complexului Fe^{3+}-transferină, iar la valori de *p*H mai acide, în sens invers. M o r g a n (1969) este totuși de părere că celulele hepatice elimină Fe printr-un mecanism care nu necesită un sistem dependent de energie. O altă funcție a proteinelor care leagă Fe^{3+} este întrevăzută pe baza acțiunii lor bacteriostatice, ceea ce deschide perspectiva utilizării lor în combaterea infecțiilor (M a s s o n și a l ț i i, 1969).

7.1.3 Fetuina

Este o α-globulină cu caracter acid, identificată de P e d e r s e n (1944) în serul fătului de bovine, unde formează aproximativ 45% din proteinele plasmatice, și a fost separată prin precipitarea fracționată cu sulfat de

* Modul de legare a componentei glucidice în transferine amintește tipul de legături întîlnite în hormonii glicoproteici (vezi pag. 299—300).

amoniu și alcool etilic. Fetuina are o masă moleculară cuprinsă între 43 000—49 000, *p*H izoelectric 3,4—4,1 după deionizare, nu precipită prin fierbere în apă distilată. În mediu acid (*p*H 3,5) masa moleculară a fetuinei variază între 71 000 și 95 500 daltoni, ceea ce denotă asocierea moleculelor. Caracterul acid al fetuinei este dat de prezența în molecula ei a acidului sialic (S p i r o, 1960) prin a cărei îndepărtare molecula își modifică unele proprietăți fizico-chimice (mobilitate electroforetică, absorbție în *UV*, procentaj de structură α-helix, viscozitate și altele) și este mai ușor hidrolizată de tripsină.

Resturile aminoacizilor din molecula fetuinei alcătuiesc o singură catenă polipeptidică și aproximativ 78% din molecula ei, iar cele 22% rămase sînt formate din resturi de *hexoze* — 7,4% (galactoză și manoză), *aminoglucide* — 4,5% (2-amino-2-deoxiglucoză, 2-amino-2-deoxigalactoză) și *acid sialic* — 7,0% (acid N-acetilneuraminic). Analiza componentei glucidice a evidențiat prezența a trei unități heteroglucide legate, probabil, printr-o legătură covalentă care se formează între C_1 al unui rest de N-acetilglucozamină cu o grupare amidică a unui rest de asparagină (fig. 7.3).

S p i r o (1960—1964) în urma unor ample studii în care a utilizat hidroliza enzimatică treptată și specifică a moleculei de fetuină ajunge la concluzia că secvența catenei oligoglucidice terminale a celor trei unități glucidice ale fetuinei sînt N-acetilneuraminozil-(2→3)-β-*D*-galactopiranozil-(1→4)-N-acetil-*D*-glucozamină și că cele trei catene glucide sînt legate prin intermediul unei regiuni alcătuită din manoză și un rest de N-acetilhexozamină și printr-o legătură glicopeptidică de catena polipeptidică. Ulterior, S p i r o (citat după G r a h a m, 1972) a putut de-

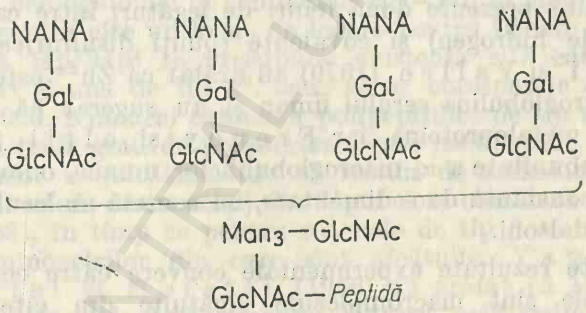


Fig. 7.3. — Structura părții glucidice a fetuinei.

monstra că fetuina conține de fapt trei unități heteroglucidice alcătuite din acilgalactoză, manoză, acid sialic și N-acetilglucozamină care alcătuiește fracția principală și o fracție glicopeptidică minoră formată din acid sialic, galactoză și N-acetilgalactozamină. Componenta glucidică este legată de peptidă printr-o legătură N-acetilgalactozamină-serină (fig. 7.3).

Deși se cunoaște că fetuina are o acțiune stimulatoare asupra creșterii celulelor HeLa și a culturilor celulare de fibroblast-B rolul ei biologic rămîne să fie stabilit.

7.1.4 α_2 -Macroglobulinele

Sînt *proteine plasmatice* care alcătuiesc aproximativ 3% din proteinele plasmatice ale mamiferelor; au fost separate inițial prin precipitare fracționată a serului sanguin cu sulfat de amoniu la *p*H 7, ulterior fiind obținute prin numeroase alte metode (ultracentrifugare, gel-filtrare, cromatografie pe coloane de DEAE-celuloză etc.). Sînt proteine ușor solubile în apă la valori de *p*H neutru și precipită în soluții neutre de $(NH_4)_2SO_4$; masa moleculară a α_2-macroglobulinelor în serul proaspăt este de $0{,}5 \times 10^6$ daltoni, dar după o purificare în condiții blînde masa lor moleculară este de 1×10^6, ceea ce dovedește existența lor sub forma unui dimer.

Componenta glucidică a acestor glicoproteine este alcătuită din galactoză, manoză, glucozamină, fucoză sau 6-deoxihexoză, acid N-acetilneuraminic în proporție de 8—11%. Numărul unităților glucidice din α_2-macroglobulina umană este de 31—35 și se presupune că acestea sînt în majoritatea lor unite cu componenta proteică printr-o legătură de tip glicozilamină. Componenta proteică este alcătuită din 720 resturi de aminoaciz din care peste 530 sînt acizi diaminomonocarboxilici. Determinarea numărului și a naturii aminoacizilor din poziția N-terminală a α_2-macroglobulinelor a sugerat prezența mai multor catene polipeptidice diferite, care în cazul α_2-macroglobulinei umane poate fi de ordinul 20—25 (R a z a f i m a h a l e o și a l ț i i 1969). Același autor studiind disocierea α_2-macroglobulinelor umane în prezența ureii și a clorhidratului de guanidină și influența reducerii și alchilării ajunge la concluzia că în acest tip de glicoproteine sînt prezente două feluri de legături între catene: legături necovalente (de hidrogen) și covalente (punți disulfurice). Pe de altă parte, P a r i s i și V a l l e e (1970) au arătat că Zn^{2+} este puternic asociat cu α_2-macroglobulina serului uman și au sugerat că aceste macroglobuline sînt metaloproteine, iar F r e n o y și a l ț i i (1972) izolează și purifică o subunitate a α_2-macroglobulinelor umane, omogenă electroforetic și, după constanta de sedimentare, cu o masă moleculară de aproximativ 83 000 daltoni.

Toate aceste rezultate experimentale converg către concluzia că α_2-macroglobulinele sînt macromolecule alcătuite din cîteva subunități monomer unite între ele prin diferite tipuri de legături. G e n t o u (1968 a, b) a elaborat un model al structurii cuaternare la α_2-macroglobulinei umane în care monomerii prezintă două zone distincte: una — apolară și hidrofobă, cealaltă — polară și hidrofilă, care formează două tipuri de dimeri — dimeri asociați prin zonele apolare și dimeri asociați prin interacțiuni polare.

α_2-macroglobulinele serice au proprietatea de a lega tripsina, plasmina, trombina și de a diminua activitatea lor hidrolitică acționînd și ca substanțe protectoare ale activității esterolitice a acestor proteaze (G e n t o u, 1968 b). Funcția lor rămîne totuși necunoscută.

7.1.5 Haptoglobulinele

Fac parte din fracţia α_2-globulinică a proteinelor plasmatice şi alcătuiesc aproximativ 1—1,3% din cantitatea totală a acestora, fiind capabile să formeze cu hemoglobina, în proporţii stoichiometrice, complecşi nedisociabili Hp—Hb, uşor solubili în apă (Jayle şi alţii, 1951, 1952, 1954, 1956). Haptoglobulinele sînt prezente în numeroase lichide şi umori biologice: plasma sanguină, lichid pleural, urină, lichid cerebrospinal etc. Haptoglobulinele variază de la persoană la persoană, sînt eterogene din punct de vedere molecular şi electroforetic, la persoanele sănătoase putînd fi clasificate în trei tipuri diferite — la unii homozigoţi Hp^1/Hp^1, cu o singură bandă electroforetică, la alţii homozigoţi Hp^2/Hp^2 şi la heterozigoţi Hp^2/Hp^1 cu o serie de benzi electroforetice. Această varietate de forme electroforetic — separabile a fost evidenţiată numai în cazul Hp umane şi este un polimorfism condiţionat genetic; celelalte specii de mamifere, inclusiv primatele, posedă o singură bandă proteică asemănătoare ca proprietăţi cu forma Hp^1 de la om (Sutton, 1972).

Haptoglobulinele sînt glicoproteine alcătuite din două tipuri diferite de catene polipeptidice-α şi β; catenele de tip α sînt la rîndul lor de trei feluri $hp\alpha^{1F}$, $hp\alpha^{1S}$ şi $hp\alpha^2$ şi diferă între ele după masa moleculară — α^{1F} şi α^{1S} au o masă moleculară de 8 900—9 000, iar α^2 —17 000—18 000, în timp ce catenele de tip β sînt mult mai mari şi au masa moleculară de aproximativ 40 000 (Smithies şi alţii, 1962; Cheftel şi Moretti, 1966). Structura Hp şi rolul diferitelor tipuri de catene polipeptidice au făcut obiectul a numeroase ipoteze, din care enumerăm numai cîteva. O haptoglobulină este formată din 2 catene de tip α şi 2 catene de tip β; în acest caz catenele de tip α^{1F} şi α^{1S} produc structuri similare şi legarea hemoglobinei în complexul Hp—Hb se face la nivelul catenelor β, care conţin cîte un locus de legare pentru fiecare catenă. Pentru haptoglobulina Hp^2/Hp^1 se presupune existenţa a 3 catene de tip β, două de tip α^1 şi una de tip α^2, ceea ce ar corespunde cu masa moleculară de 165 000. Numărul catenelor polipeptidice de tip α din haptoglobulinele cu un înalt grad de polimerizare este necunoscut. Structura primară a catenelor α^1 (alcătuite din 83 resturi de aminoacizi) şi α^2 (care conţin 142 resturi de aminoacizi) din Hp a fost elucidată de Black şi Dixon (1968), în timp ce pentru catenele de tip β se cunoaşte numai compoziţia aminoacizilor din care sînt alcătuite. Yayle şi alţii (1966), Cheftel şi Moretti (1966) au arătat că Hp conţin între 11—18,6% glucide (galactoză, manoză, glucoză, acid sialic, fucoză) legate în principal de catenele β, fiecare catenă posedînd patru componente glucidice conexate lateral.

Haptoglobulinele formează complecşi cu HbA, HbA_2, HbF şi HbI, cu toate variantele de hemoglobină umană şi cu Hb altor specii, dar nu formează complecşi cu mioglobina, HbH şi Hb Bart, ceea ce a sugerat ideea că variantele de Hb care nu conţin catene polipeptidice α sînt incapabile să dea complecşi, deci aceste catene α au o importanţă majoră pentru Hp—Hb. Globina din Hb este absolut necesară pentru formarea complexului şi toate formele fiziologice ale Hb—HbO_2 $HbCO_2$, cianmethemoglobina, HbCO sînt capabile să reacţioneze cu Hp cu excepţia deoxihemoglobinei.

Rolul biologic al haptoglobulinelor nu este pe deplin elucidat. Se presupune că Hp—Hb preîntîmpină trecerea Hb în filtratul glomerular și sînt evitate astfel unele suprasolicitări renale. Hp sînt inhibitori puternici ai catepsinei *B* jucînd în felul acesta un rol de protecție a țesuturilor inflamate față de acțiunea acestei enzime. B l a c k și D i x o n (1968) analizînd asemănările structurale dintre catenele hpα și lanțurile ușoare ale γ-globulinei presupun originea ancestrală comună a acestor Hp și deci o eventuală implicare în elaborarea răspunsului imun. Dar dovezile experimentale sînt insuficient de concludente. (S u t t o n, 1972).

7.1.6 Glicoproteine cu activitate hormonală

Glicoproteinele cu activitate hormonală sînt substanțe biopolimere alcătuite dintr-o componentă zaharidică (oligozaharid sau polizaharid) legată covalent de componenta de natură proteică. Hormonii glicoproteici fac parte din categoria de hormoni reuniți sub denumirea de *gonadotropine*, care sînt alcătuite din două subunități proteice desemnate prin literele alfabetului grecesc α și β ce sînt legate între ele necovalent. Subunitățile α ale gonadotropinelor au structură chimică similară și pot fi schimbate, substituite de la un hormon gonadotrop la altul, deoarece specificitatea activității biologice a hormonilor gonadotropi este conferită de subunitățile β, denumite și *subunități hormon specifice*.

Dintre hormonii de natură glicoproteică fac parte — *tirotropina* * sau *hormonul tirotrop* (TSH), *folitropina* sau *hormonul foliculostimulator* (FSH), *lutropina* sau *hormonul luteinizant* sau *hormonul stimulător al celulelor interstițiale* (LH sau ICSH) și *gonadotropina corionică* sau *coriogonadotropina* izolată de la om (HCG — „human chorionic gonadotropin".)

Studiul structurii și proprietăților fizico-chimice ale componentelor proteice din hormonii gonadotropi de natură glicoproteică nu mai pune astăzi probleme, însă precizarea naturii componentei oligo- sau polizaharidice, precum și a locului de grefare a ei pe subunitățile α și β continuă să ridice numeroase dificultăți. În compoziția componentei glucidice au fost identificate următoarele monozaharide și derivații lor: fucoză, galactoză, manoză, glucozamină, galactozamină, 2-acetamido-2-deoxiglucoză, acid N-acetilneuraminic sau sialic, în proporții diferite în funcție de gonadotropină.

B a h l (1971) utilizînd degradarea enzimatică succesivă a HCG a precizat că subunitățile zaharidice identice (fig. 7.4,a), din subunitățile β, sînt diferite ca structură și compoziție de cele ale subunităților α (figura 7.4, b). Tot B a h l (1969), a demonstrat că aceste componente glucidice sînt legate în HCG de componentele proteice printr-o legătură de tipul N-acetilglucosaminilasparagină. Pe de altă parte, resturile de glucozamină, care nu apar în structurile menționate în figura 7.4 sînt, după opinia lui B a h l, legate de componenta proteică la nivelul resturilor de serină sau de treonină printr-o legătură covalentă de natura N-acetilgalactozaminilserină sau N-acetilgalactozaminiltreonină.

* Denumirile scrise cursiv sînt recomandate de IUPAC-IUB în 1975.

În glicoproteine componenta de natură zaharidică este legată întotdeauna la restul de *Asn* care face parte dintr-o secvență tripeptidică de tipul :

Asn — X — Thr sau Asn — X — Ser
|
CHO

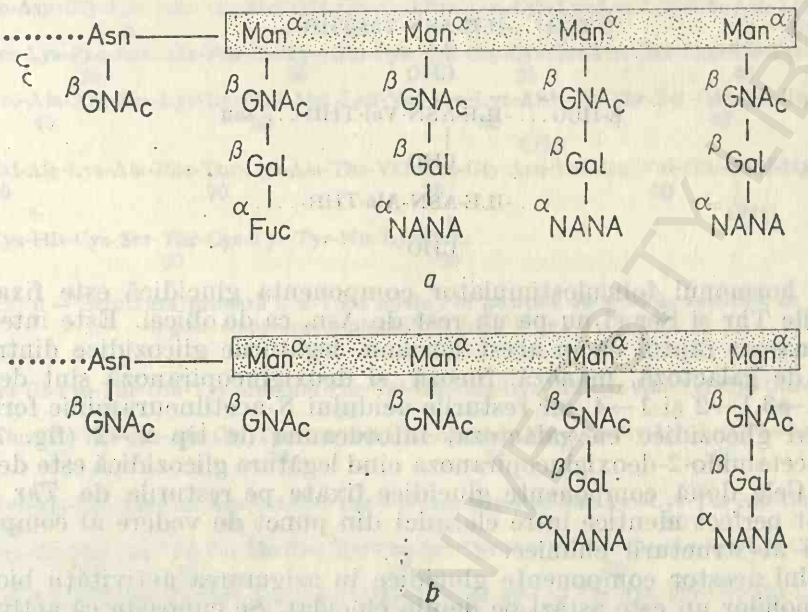


Fig. 7.4. — Structura unităților glucidice din compoziția coriogonadotropinei umane (HCG). Subunitatea α conține două componente glucidice de tip *a*, iar subunitatea β a HCG — două componente glucidice de tip *b*. Prescurtările utilizate :

GNAc — 2-acetamido-2-deox glucoza ; *Man* — manoza ; *Gal* — galactoza ; *Fuc* — fucoza NANA — acid N-ace tilneuraminic. Datele sînt redate după B a h l (1971).

În preparatele de LH, TSH, și HCG analizate de B a h l în vecinătatea componentei glucidice au fost identificate resturile următorilor aminoacizi (resturile identice sînt scrise cu litere majuscule) :

— *În unitățile α ale hormonilor* :

α-LH ....- Lys — ASN-Ile-THR- .... sau
|
CHO

....-*Glu*-ASN-*His*-THR-....
|
CHO

α-TSH...-Lys-ASN-Ile-THR-.... sau
|
CHO

....-*Glu*-ASN-*His*-THR- ....
|
CHO

Aminoacizii scrişi cu litere aldine şi cursive arată similitudinea structurală între unităţile α-LH şi α-TSH;

— *În unităţile β ale hormonilor*:

β-LH ...-ILE-ASN-Ala-THR-....
|
CHO

β-TSH...-ILE-ASN-*Thr*-THR-....
|
CHO

β-HCG...-ILE-ASN-Val-THR-... sau
|
CHO

...-ILE-ASN-Ala-THR-....
|
CHO

În hormonul foliculostimulator componenta glucidică este fixată pe resturile Thr şi Ser şi nu pe un rest de Asn, ca de obicei. Este interesant de remarcat faptul că în acest hormon, legăturile glicozidice dintre resturile de galactoză, manoză, fucoză şi deoxiglucopiranoză sînt de tipul 1→6,1→3,1→2 şi 1→4, iar resturile acidului N-acetilneuraminic formează legături glicozidice cu galactoza, întotdeauna de tip 2→2 (fig. 7.4) şi cu 2-acetamido-2-deoxiglucopiranoza cînd legătura glicozidică este de tipul 2→6. Cele două componente glucidice fixate pe resturile de *Thr* şi *Ser* nu sînt perfect identice între ele, nici din punct de vedere al compoziţiei şi nici al structurii chimice.

Rolul acestor componente glucidice în asigurarea activităţii biologice a hormonilor nu este astăzi pe deplin elucidat. Se cunoaşte că activitatea unor hormoni, de exemplu, a HCG este mică dacă preparatul este prelucrat cu neuraminidază şi acidul este îndepărtat; în cazul LH şi FSH hidroliza acidului sialic din moleculă duce la îndepărtarea lor din circulaţia sanguină. Din această ultimă observaţie, Morell, Gregoriadis, Scheinberg, Hickman, Ashwell (1971) sugerează că partea glucidică a hormonului, sau în cel mai rău caz restul acidului sialic, joacă un rol determinant în procesul de transport de la locul de eliberare sau secreţie la celulele sau organele „ţintă" unde îşi exercită acţiunea. Bahl (1971) emite ipoteza, din punct de vedere teoretic plauzibilă, conform căreia componenta glucidică ar putea îndeplini funcţia de protecţie a componentei proteice împotriva unui atac proteolitic.

Structura primară a subunităţilor α şi β ale hormonului tirotrop, precum şi localizarea componentei de natură zaharidică sînt redate în figura *7.5. a, b.*

Subunităţile hormonului tirotrop izolat de la bovine disociază şi se recombină sub influenţa factorilor fizico-chimici. Astfel, de exemplu, disocierea lor are loc în soluţii acide diluate, la pH < 4 sau în soluţii concentrate de uree (8—10 M) şi viteza reacţiei de disociere creşte sub influenţa temperaturii în intervalul 25—37°C. Alcalinizarea mediului de reacţie pînă la pH 7—9 şi incubarea timp de 72 ore la 37°C duce la recombinarea subunităţilor cu restabilirea activităţii hormonale în proporţie de 60—70% (Ingham, Aloj, Edelhoch, 1974). Se presu-

pune că disocierea hormonului este însoţită de modificări conformaţionale ale subunităţilor sau numai a unei subunităţi, proces în care resturile de tirozină au un rol important (I n g h a m şi a l ţ i i, 1974).

W o l f şi a l ţ i i (1974) consideră că subunitatea α condiţionează schimbările conformaţionale ale subunităţii β din TSH, care în hormonul

```
Phe-Pro-Asp-Gly-Glu-Phe-Thr-Met-Glx-Gly-Cys-Pro-Glx-Cys-Lys-Leu-Lys-Glu-Asn-Lys-Tyr-
 1                  5                  10                  15                  20
-Phe-Ser-Lys-Pro-Asx-Ala-Pro-Ile-Tyr-Gln-Cys-Met-Gly-Cys-Cys-Phe-Ser-Arg-Ala-Tyr-Pro-
                25                  30                  35                  40
-Thr-Pro-Ala-Arg-Ser-Lys-Lys-Thr-Met-Leu-Val-Pro-Lys-ASN-Ile-Thr-Ser-Glx-Ala-Thr-Cys-
          45                  50                  55  |               60
                                                    CHO
-Cys-Val-Ala-Lys-Ala-Phe-Thr-Lys-Ala-Thr-Val-Met-Gly-Asn-Val-Arg-Val-Glx-ASN-His-Thr-
     65                  70                  75                  80  |
                                                                    CHO
-Glu-Cys-His-Cys-Ser-Thr-Cys-Tyr-Tyr-His-Lys-Ser.
 85                  90                  96
```

Fig. 7.5. *a* — Structura primară a α-TSH bovin ; în poziţiile 56 şi 82 la resturile de *Asn* sînt legate componente glucidice (după P i e r c e, 1971).

```
Phe-Cys-Ile-Pro-Thr-Glu-Tyr-Met-Met-His-Val-Glu-Arg-Lys-Glu-Cys-Ala-Tyr-Cys-Leu-Thr-Ile-
 1                  5                  10                  15                  20
ASN-Thr-Thr-Val-Cys-Ala-Gly-Tyr-Cys-Met-Thr-Arg-Asx-Val-Asx-Gly-Lys-Leu-Phe-Leu-Pro-
   |        25                  30                  35                  40
 CHO
-Lys-Tyr-Ala-Leu-Ser-Gln-Asp-Val-Cys-Thr-Tyr-Arg-Asp-Phe-Met-Tyr-Lys-Thr-Ala-Glu-Ile-
      45                  50                  55                  60
-Pro-Gly-Cys-Pro-Arg-His-Val-Thr-Pro-Tyr-Phe-Ser-Tyr-Pro-Val-Ala-Ile-Ser-Cys-Lys-Cys-Gly-
 65                  70                  75                  80                  85
-Lys-Cys-Asx-Thr-Asx-Tyr-Ser-Asx-Cys-Ile-His-Glu-Ala-Ile-Lys-Thr-Asn-Tyr-Cys-Thr-Lys-Pro-
                90                  95                  100                 105
```

Fig. 7.5. *b* — Structura primară a β-TSH bovin ; componenta glucidică este fixată pe restul de *Asn* din poziţia 23 (după P i e r c e, 1971).

integral (intact) influenţează recombinarea sau „cuplarea" unităţilor şi restabilirea activităţii biologice.

L i u-W a n-K y n g şi a l ţ i i (1974) au arătat că în procesul recombinării celor două catene α şi β, în cazul ICSH, asemănător ca structură cu TSH, un rol deosebit de important îl are restul de *Lys* din subunitatea α datorită sarcinii electrice a grupării ε-amino ; resturile de *Lys* prezente în subunitatea β nu îndeplinesc un rol critic în acest proces. De aici rezultă că fiecare catenă polipeptidică în parte, denumite convenţional subunitate, îşi are un rol bine precizat în asigurarea proprietăţilor biologice ale hormonului. Disociaţia LH (ICSH) are loc în mediu acid, la *p*H 2,1—3,6, iar recombinarea subunităţilor la *p*H 7,5 şi în două etape distincte (B e w l e y şi a l ţ i i, 1974). Hormonul luteinizant obţinut după recombinarea subunităţilor se deosebeşte după proprietăţile lui fizico-chimice de hormonul luteinizant nativ şi posedă numai 50—60% din activitatea acestuia.

Studiul comparat al structurii primare a subunităţilor de β-LH (β-ICSH) şi β-TSH a relevat faptul că 36 de resturi de aminoacizi sînt co-

mune, adică 1/3, ceea ce sugerează faptul că aceste două molecule — ICSH și TSH, derivă, probabil, dintr-o moleculă ancestrală comună (fig. 7.6).

(A) Acyl-Ser-Arg-Gly-Pro-Leu-Arg-Pro-Leu-Cys-Gln-Pro-Ile-ASN-
1 5 10 CHO

(B) Phe-Cys-Ile-Pro-Thr-Glu-
1 5

(A) -Ala-Thr-Leu-Ala-Ala-Glu-Lys-Glu-Ala-Cys-Pro-Val-Cys-Ile-
15 20 25

(B) -Tyr-Met-Met-His-Val-Glu-Arg-Lys-Glu-Cys-Ala-Tyr-Cys-Ile-
10 15 20

(A) -Thr-Phe-Thr-Thr-Ser-Ile-Cys-Ala-Gly-Tyr-Cys-Pro-Ser-Met-
30 35 40

(B) -Thr-Ile-ASN-Thr-Thr-Val-Cys-Ala-Gly-Tyr-Cys-Met-Thr-Arg-
CHO 25 30

(A) -Lys-Arg-Val-Leu-Pro-Val-Ile-Leu-Pro-Pro-Pro-Met-Pro-Gln-
45 50 55

(B) -Asx-Val-Asx-Gly-Lys-Leu-Phe-Leu-Pro-Lys-Tyr-Ala-Leu-Ser-
35 40 45

(A) -Arg-Val-Cys-Thr-Tyr-His-Glu-Leu-Arg-Phe-Ala-Ser-Val-Arg-
60 65

(B) -Gln-Asp-Val-Cys-Thr-Tyr-Arg-Asp-Phe-Met-Tyr-Lys-Thr-Ala-
50 55 60

(A) -Leu-Pro-Gly-Cys-Pro-Pro-Gly-Val-Asp-Pro-Met-Val-Ser-Phe-
70 75 80

(B) -Glu- Ile-Pro-Gly-Cys- Pro-Arg-His-Val-Thr-Pro-Tyr-Phe-Ser-
65 70 75

(A) -Pro-Val-Ala-Leu-Ser-Cys-His-Cys-Gly-Pro-Cys-Arg-Leu-Ser-
85 90 95

(B) -Tyr-Pro-Val-Ala-Ile-Ser-Cys-Lys-Cys-Gly-Lys-Cys-Asx-Thr-
80 85 90

(A) -Ser-Thr-Asp-Cys-Gly-Pro-Gly-Arg-Thr-Glu-Pro-Leu-Ala-Cys-
100 105 110

(B) -Asx-Tyr-Ser-Asx-Cys-Ile-His-Glu-Ala-Ile-Lys-Thr-Asn-Tyr-
95 100

(A) -Asp-His-Pro-Pro-Leu-Pro-Asp-Ile-Leu.
115 120

(B) -Cys-Thr-Lys-Pro-Gln-Lys-Ser-Tyr-Met
105 110 113.

Fig. 7.6. — Structura primară a unităților β-LH (ICSH-β) izolat de la oaie în comparație cu secvența aminoacizilor din molecula de TSH-β din preparatele obținute de la bou. În molecula de β-LH (ICSH-β) componenta glucidică este fixată de restul de *Asn*-13 pe cînd în TSH — pe un rest similar situat în poziția 23. Resturile de aminoacizi comune pentru ambele preparate sînt scrise cu litere groase și constituie peste 1/3 din molecula fiecărei subunități hormonale (după datele lui Papkoff, 1971, Sairam și alții, 1972, Ward și Liu, 1971).

Saxena și Rathnam (1971) pe baza analizelor chimice și a proprietăților imunologice ale subunităților α și β ale TSH și LH ajung la concluzia că cei doi hormoni sînt alcătuiți din două subunități neidentice, de natură glicoproteică și sînt legate între ele necovalent. În ambii hormoni subunitățile α sînt *hormon nespecifice* și pot fi omoloage, în timp ce subunitățile β sînt *hormon specifice* și responsabile pentru mecanismul de acțiune al hormonilor. În sprijinul acestor afirmații sînt și datele menționate de Papkoff (1971) care susține că FSH este constituit din două subunități: α-FSH, care conține o cantitate apreciabilă de glucide (25%) și β-FSH care conține 6% glucide; cele două subunități, inactive în stare separată, sînt active împreună cînd refac activitatea hormonului într-un procent de 90%. Același autor a arătat că β-FSH se poate combina cu α-ICSH — generînd o activitate hormonală specifică FSH.

În cazul gonadotropinei corionice umane cele două subunități se deosebesc între ele după compoziția chimică și activitățile lor hormonale. Astfel, subunitățile α sînt mai bogate în histidină, valină, metionină, tirozină, fenilalanină, glicocol și acid aspartic și au o activitate de tip LH, în timp ce subunitățile β conțin însemnate cantități de galactoză, galactozamină și acid sialic și au activitate de tip FSH. Ansamblul celor două subunități dă naștere unei glicoproteine cu activitate specifică coriogonadotropinei umane. S-a demonstrat că β-subunitățile LH și HCG nu pot substitui β- subunitate FSH cu restabilirea activității hormonale specifice acesteia, dar că subunitățile α ale LH și HCG pot înlocui deplin subunitatea α-a FSH. Dovezile experimentale menționate mai sus converg către concluzia că activitatea hormonilor glicoproteici este condiționată întotdeauna de subunitatea β a acestora și că între α-subunitățile acestor hormoni—LH, FSH și HCG — există o omologie structurală.

7.1.7 Tiroglobulina

În tiroida normală aproape 70% din cantitatea totală de iod tiroidian se găsește sub formă de *tiroglobulină*, o glicoproteină care conține 1,2% acid sialic și are o masă moleculară de 660 000—675 000. Tiroglobulina a fost izolată de la numeroase mamifere, primate și de la om, purificată și studiată imunologic. Dimensiunile mari ale acestei proteine determină localizarea ei exclusivă în interiorul foliculilor tiroidieni și nu pătrunde în circulație decît în cazul lezării membranelor foliculare.

În preparatele de tiroglobulină de porc Fukuda și Egami (1971) au identificat catene heteroglucidice alcătuite în unele cazuri din 4—8 resturi de manoză și două resturi de glucozamină (masa moleculară 1 000—1 700), iar în alte cazuri din manoză, glucozamină, acid sialic, fucoză și galactoză (masa moleculară de aproximativ 3 600).

Cea mai mare parte a tiroglobulinei și a precursorilor ei în cazul tumorilor tiroidiene la șobolan este localizată în fracția microsomală, tiroglobulina liberă sau solubilă este puțină sau absentă, probabil, datorită deficienței mecanismului de eliberare a proteinelor din reticulul endoplasmatic (Salabe, Robbins, 1970).

Molecula de tiroglobulină este constituită din patru catene polipeptidice, fiecare alcătuită din aproximativ 576 resturi de aminoacizi. În soluții concentrate, moleculele de tiroglobulină se asociază în agregate cu o masă moleculară de 17 000 000 (B a b a e v și a l ț i i, 1972).

Tiroglobulina este o proteină eterogenă din punct de vedere a masei moleculare; prin ultracentrifugarea preparatelor ei se obțin compuși intermediari cu 36 S, 8 S, 12 S, 27 S, și 32 S. Componenta proteică cu constanta de sedimentare egală cu 19 S are o masă moleculară de 660 000 și constă din două subunități egale — 12 S — fiecare la rîndul lor alcătuite din cîte două catene polipeptidice unite prin punți disulfurice. S-a calculat, de asemenea, că molecula de tiroglobulină conține circa 100—120 resturi de tirozină și din acestea numai 70% sînt iodurate. N u n e z și M a u c h a m p (1965) consideră că procesul de iodurare a tirozinei este independent de biosinteza subunităților proteice, considerate de unii autori pretiroglobulină și se realizează în veziculele coloidale și în celulă. Iodurarea chimică a pretiroglobulinelor este însoțită de schimbări ale conformațiilor moleculei și de creșterea constantei de sedimentare.

Tot din tiroidă au fost separate și alte proteine iodurate, decelate fie în citosol, fie în particulele subcelulare. Printre acestea sînt *tiralbumina*, S_1-*iodproteina* sau *compusul X* care se întîlnește, de regulă, în tiroidă și conține aproximativ 4% din iodul tiroidian.

Rolul principal al tiroglobulinei constă în *participarea ei la biosinteza și depozitarea hormonilor tiroidinei în coloidul folicular al glandei tiroide.* Din acest punct de vedere tiroida este singura glandă cu secreție internă care poate stoca hormoni într-o cantitate suficientă pentru o perioadă de 60—70 zile.

7.2. LIPOPROTEINE

Lipoproteinele sînt proteine în care componenta prostetică este de natură lipidică: acizi grași, triacilgliceroli, colesterol liber și/sau *esterificat, fosfolipide.* Complecșii lipoproteici *au un caracter macromolecular și intră în constituția unor structuri subcelulare* (membrane celulare, mitocondrii) și a unor lichide circulante, de exemplu, plasma sanguină. Complecșii pe care proteinele îi formează cu lipidele, așa-numitele cenapse lipoproteice au un rol deosebit de important în solubilizarea și transportul lipidelor, precum și a altor substanțe liposolubile (sterolii, carotenoidele și unii hormoni).

Forțele care asigură legarea componentei proteice cu componenta lipidică sînt: forța de coeziune (v a n d e r W a a l s) și forțe datorită legăturilor ionice care se pot stabili între restul $-N^+(CH_3)_3$ al colinei (din lecitine) sau $-O-PO_3H^-$ al acidului fosforic (din acizii fosfatidici) pe de o parte și ionii $-COO^-$ și $-^+NH_3$ din proteine, pe de altă parte.

Cele mai importante lipoproteide sînt cele din plasmă sau din serul sanguin, *chilomicronii,* α și β-*lipoproteinele* și albuminele legate cu acizii grași neesterificați.

7.2.1 α - Lipoproteinele

Sînt *proteine care conţin în proporţii egale o componentă de natură proteică şi lipide.* Dintre acestea cea mai mare parte o formează *fosfolipidele* (20—30% din cantitatea totală a lipidelor prezente în α-lipoproteine) şi *colesterolul* (16—20%, cea mai mare parte sub formă esterificată), *acizii graşi liberi, sub formă de urme, şi triacilglicerolii* (2—6%). Componenta de natură proteică are o masă moleculară de aproximativ 10^5 daltoni, este constituită din mai multe subunităţi identice a căror masă moleculară variază între 23 000 şi 32 000 daltoni şi al căror număr variază în funcţie de gradul de densitate al lipoproteidelor.

După unii autori α-lipoproteinele au rolul de a *menţine în soluţie lipidele provenite din alimente şi triacilglicerolii endogeni.*

În funcţie de viteza de migrare electroforetică şi de comportarea în ultracentrifugă α-lipoproteinele au fost împărţite în două fracţii HDL_2 şi HDL_3-lipoproteine de înaltă densitate ($1{,}063 < d < 1{,}21$) spre deosebire de lipoproteinele de mică densitate sau β-lipoproteine.

7.2.2 β-Lipoproteinele

Sînt proteine ce conţin lipide, au o masă moleculară relativ mare şi din punct de vedere analitic sînt *mult mai eterogene decît α-lipoproteinele.* β-*lipoproteinele* grele au *d* cuprinsă între 1,019 şi 1,063, masa moleculară de aproximativ 2×10^6 daltoni şi conţin de patru ori mai multe lipide decît proteine. *Componenta lipidică* este constituită în cea mai mare parte din *colesterol esterificat* (35—40%), *colesterol liber* (8—12%) *sau asociat cu fosfolipidele* (20—25%) precum şi din mici cantităţi de *triacilgliceroli* (5—10%). Componenta proteică a β-lipoproteinelor nu poate fi separată de cea lipidică, din care cauză este mai puţin cunoscută atît ca structură chimică cît şi ca interacţiune cu lipidele. Datorită faptului că în această fracţie de lipide predomină colesterolul liber şi esterificat (45—55%) se presupune că fracţia β-lipoproteinelor grele îndeplineşte rolul de agent de vehiculare a colesterolului seric.

β-Lipoproteinele uşoare constituie o fracţie a lipoproteinelor serice care are o *d* cuprinsă între 1,006 şi 1,019 şi este *bogată în triacilgliceroli* (15—20% din componenta lipidică a fracţiei).

β-Lipoproteinele foarte uşoare se caracterizează printr-un *mare conţinut de triacilgliceroli* (50—70%) şi printr-o *componentă proteică de dimensiuni mici* care alcătuieşte numai 6—12% din moleculă. Densitatea lor este mai mică de 1,006. Analiza componentei prin diferite metode chimice a evidenţiat prezenţa în aceste lipoproteine a mai multor *catene polipeptidice* (în poziţia N-terminală au fost identificaţi patru aminoacizi diferiţi; examinarea în ultracentrifuga analitică a arătat că sînt prezente cel puţin trei subfracţii cu constante de sedimentare diferite etc.). După conţinutul extrem de ridicat în triacilglicerol *se presupune că această fracţie are rolul de a vehicula în sînge aceste lipide neutre.*

7.3. FOSFOPROTEINELE

Alcătuiesc o *grupă de proteine răspîndite în țesuturile mamiferelor* (ficat, plămîni, splină, inimă, creier, prostată, retină etc.) în bacterii și levuri; se caracterizează prin faptul că *au în molecula lor resturi de acid ortofosforic esterificate cu resturile de serină și/sau de treonină.* Fosforul din fosfoproteine este hidrolizat numai în mediu ușor alcalin sau poate fi eliberat sub acțiunea unor enzime specifice — fosfoproteinfosfatazei.

Din fosfoproteine fac parte *cazeina, ovalbumina, vitelina, vitelenina, fosvitina,* unele enzime din categoria serinenzimelor: *pepsina, hexokinaza, fosfoglucomutaza.*

Cazeina este fosfoproteina cea mai bine studiată, care s-a dovedit eterogenă electroforetic și după conținutul procentual al fosforului. Cazeina din laptele de vacă poate fi fracționată în α-, β- și γ- cazeină, proporțiile dintre fracții fiind de 75 : 20 : 5, iar conținutul fosforului în acestea de 0,96 ; 0,52 și respectiv 1%. Masa moleculară a cazeinei este de 75 000—100 000 daltoni și fosforul este prezent în proporție de 40% sub formă de monoesteri, 40% sub formă de diesteri, iar 20% sub formă de pirofosfat și este legat de resturile de Ser și Tre. L i n d e r s t r o m L a n g a izolat din cazeină numeroase peptide și a ajuns la concluzia că resturile fosfat alcătuiesc un „mediu" al cazeinei cu structura:

gruparea fosfat din molecula cazeinei stabilizînd legătura peptidică din vecinătatea ei, în imediata apropiere a resturilor de *Ser* fosforilată găsindu-se de regulă resturi de acid glutamic.

Ovalbumina este fosfoproteina care alcătuiește 70% din proteinele albușului de ou, electroforetic neomogenă, separată în două fracții: fracția A_1 — formează 80% din proteinele albușului de ou și conține 2 atomi de fosfor per mol proteină și fracția A_2 formează 15% și conține un atom de fosfor per mol proteină. Păstrarea îndelungată a soluțiilor de ovalbumină este însoțită de hidroliza cîtorva resturi de aminoacizi și de transformarea ei în placalbumină, iar incubarea cu *Bacillus subtilis* duce la hidroliza fosfatului prezent în placalbumină. În ovalbumină fosforul este legat de resturile de Ser, fiind izolat în peptide de structura Glu-Ser-Ⓟ-Ala; Asp-Ser-Ⓟ-Glu; Asp(Glu-Ile-Ser-Ⓟ); Ser-Ⓟ-(Ala-Glu--Ile-Ser-Ⓟ) sau Ser-Ⓟ-Ala-Glu-(Ala-Ser-Ⓟ).

Ovalbumina este o *glicoproteină de rezervă.* Masa moleculară a ovalbuminei este de aproximativ 45 000, din care circa 1 600 de daltoni revin părții glucidice, alcătuite din resturi de *D*-manoză și de 2-amino-2-deoxi-*D*-glucoză care formează 3,2—3,3% din moleculă.

Componenta glucidică este legată de cea proteică printr-o legătură de natură glicozidică ce se formează între N-acetilglucoză și resturile de asparagină ale proteinei.

Vitelina, vitelinina și **fosvitina** sînt *fosfoproteine legate cu componente de natură lipoidică și prezente în proteinele gălbenușului din ou.* Vitelina

conține 1% fosfor, vitelinina — 0,29%, iar fosvitina — 9,7%. Și în aceste fosfoproteine fosforul este legat în întregime la nivelul resturilor β-hidroxiaminoacizilor Ser și Thr. Datorită faptului că vitelina și vitelinina conțin lipide ele pot fi considerate și lipoproteine, mai corect, *fosfolipoproteine.*

7. 4. METALOPROTEINELE

Metaloproteinele sînt *heteroproteinele la care metalele sub formă ionică sînt legate complex direct de proteină* conferind acesteia proprietăți funcționale deosebite, mai ales enzimatice. Metalele care au fost puse în evidență frecvent, în structura metaloproteidelor sînt Fe, Cu, Zn, Mn.

7.4.1 Feritina

Este o *metaloproteină neporfirinică* ce conține un *procent relativ ridicat de fier* (aproxim. 23%), care poate fi îndepărtat ușor prin dializă în prezența agenților reducători (ditionit, glutation, acid ascorbic etc.) sau a substanțelor complexante (o-fenantrolină, α, α'-dipiridil ș.a.). Fierul este prezent sub forma unei micele cu o compoziție aproximativă $[(FeOOH)_8 FeOPO_3H_2]_n$ și este asociat cu o proteină denumită *apoferitina.*

În organismul mamiferelor feritina este larg răspîndită în splină, ficat, mucoasa intestinală, măduva osoasă și placentă (în citoplasmă și în microsomi). Conținutul feritinei în organismul uman adult variază între 2—4 g.

Granick (1946) a arătat că fierul alimentar induce formarea de feritină, iar Fineberg și Greenberg (1955) au demonstrat cu izotopi radioactivi că mai întîi se formează apoferitină (proteină fără fier) și numai ulterior fierul este legat cu formare de feritină. Timpul de biosinteză al unei molecule de feritină este scurt, 6 minute (Loftfield și Eigner, 1958) iar perioada de înjumătățire la cobai — de circa două săptămîni (Helvig, Greenberg, 1952).

Feritina îndeplinește în organism *funcția de depozitar al fierului* (Shoden și alții, 1953), apoferitina fiind capabilă să lege atît fierul anorganic de proveniență alimentară cît și fierul eliberat de *transferinele* din ficat, splină, măduva osoasă (Boeri, 1963). Factorii care influențează fixarea fierului în apoferitină sînt agenții oxidanți — oxigenul molecular, presiunea lui parțială, condițiile aerobe în general favorizînd depozitarea și formarea punților disulfurice în apoferitină și agenții reducători acidul uric, acidul ascorbic, condițiile anaerobe etc. — care mediază eliberarea fierului și trecerea feritinei sub formă de feritina-SH. Condițiile fiziologice stressante, șocurile hemoragice, circulația hepatică anevoioasă, anoxiile etc. conduc la eliberarea de feritină în sînge, în special, sub formă de feritina-SH (Boeri, 1963).

7.4.2 Hemosiderina

Metaloproteidă ce conţine fier, hemosiderina este în multe privinţe analoagă feritinei, de care se deosebeşte printr-un *conţinut procentual de Fe* mult mai *ridicat* — pînă la 36%—38%— şi prin faptul că poate fi evidenţiată şi histologic prin reacţia cu *albastru de Berlin*. Hemosiderinai este răspîndită în celulele sistemului reticuloendotelial la nivelul organitelor citoplasmatice denumite *siderocromi*.

Shoden şi alţii (1953) au semnalat că în cazul unor hemoragii sau al necesităţii de a acumula fier, acesta poate fi trecut direct din hemosiderină în sînge, după cum în cazul unei alimentaţii bogate în fier sau al unui proces intens de hemoliză fierul trece direct din sînge în hemosiderină.

7.4.3 Conalbumina

În albuşul de ou a fost descoperită o proteină care conţine fier, cu o masă moleculară de 87 000 şi pH_i la 6,1 (Bain şi Deutsch, 1948). O moleculă de conalbumină conţine doi atomi de fier în stare ferică care conferă proteinei o rezistenţă mai mare faţă de acţiunea alcaliilor; denaturarea proteinei sau modificarea ei neînsemnată în cursul unui tratament blînd face imposibilă legarea fierului. Conalbumina poate lega, într-o formă uşor disociabilă, şi cupru şi zinc; legarea ionilor bivalenţi Fe^{2+} şi Cu^{2+} este influenţată de prezenţa anionului HCO_3^- sau a unor anioni polibazici de tipul acidului citric.

7.4.4 Hemeritrina

Hemeritrina este un pigment roşu-violet ce conţine fier, descoperit în lichidul celomic al unor animale — *Lingula unguis, Sipunculus nudus, Phascolosoma gouldii, Siphonosoma ingens, Dendrostomum zostericolum* etc. — pigment care poate lega reversibil oxigenul. Conţinutul Fe în hemeritrină este neînsemnat — 0,8—1,0%, iar masa moleculară a acestei feroproteine, în funcţie de metoda de determinare folosită a fost găsită de 66 000—110 000. Proteina din hemeritrina larvelor de sipunculide este alcătuită din 113 resturi de aminoacizi şi are o masă moleculară de 13 500. La sipunculide această proteină formează agregate moleculare de cîte 6 subunităţi şi fiecare subunitate este capabilă să lege doi atomi de fier, iar aceştia la rîndul lor să se combine cu un atom de oxigen. În acest fel se explică, probabil, şi variaţia masei moleculare a diferitelor preparate de hemeritrină studiate.

În privinţa interacţiunilor ei cu oxigenul hemeritrina aminteşte în multe privinţe hemoglobina:

— spectrele de absorbţie ale hemeritrinei, oxihemeritrinei (hemeritrină saturată cu oxigen) şi methemeritrinei (rezultată prin oxidarea hemeritrinei sau oxihemeritrinei cu fericianură sau cu oxigen molecular sînt diferite;

— oxigenul este legat ireversibil într-o anumită proporție față de atomii de fier. După unii autori (F l o r k i n, 1933) proporția este de un atom de oxigen la trei atomi de fier, după a l ț i i (L o v e, 1957) de 1 : 2,4, iar după B o e r i (1968) de 1 : 2.

K l o t z și K l o t z (1955) au arătat că în hemeritrină fierul este bivalent, iar în oxihemeritrină — trivalent, presupunînd că oxigenul este legat sub forma unui ion peroxidic, conform ecuației:

$$\text{Hemeritrină-}(Fe^{2+})_2 + O_2 \rightleftharpoons \text{Hemeritrină-}Fe^{3+}O_2^{2-}Fe^{3+}$$

B o e r i (1968) consideră că fierul din hemeritrină este într-o stare similară, în cursul procesului de oxigenare, ca și fierul din oxihemoglobină.

7.5. METALOENZIMELE

Sînt enzime care conțin în molecula lor unul sau mai mulți ioni metalici ferm legați, în raporturi stoichiometrice. Ionii metalici îndeplinesc roluri structurale sau (și) funcționale, iar apoenzima prezintă o înaltă specificitate față de ei.

Un real progres în cunoașterea biochimiei metaloenzimelor a fost obținut prin aplicarea unor metode fizice de o deosebită finețe și de o mare putere de rezoluție : rezonanța magnetică nucleară (*RMN*), rezonanța paramagnetică electronică (*RPE*), dispersia rotatorie optică, dicroismul circular, dispersia rotatorie magnetooptică, dicroismul magnetocircular, spectroscopia în infraroșu, spectroscopia în fluorescență M ö s s b a u e r, studiul cu ajutorul razelor *X* a cristalelor acestor enzime etc. Toate aceste metode de investigare implică existența unor preparate de enzimă înalt purificate, uneori a enzimei în stare cristalină, cu activitatea catalitică perfect conservată.

În urma numeroaselor studii efectuate cu aceste metode a devenit clar că ionul metalic din structura unei metaloenzime poate îndeplini fie un rol stabilizator al structurilor terțiare și cuaternare ale enzimei, fie un rol direct în actul catalitic propriu-zis, fie ambele roluri.

Uneori, același ion metalic poate avea un rol în cazul unei enzime, pentru ca în structura alteia să îndeplinească o cu totul altă funcție. Astfel, de exemplu, în cazul zincului din carbonic anhidraza eritrocitelor bovine, ionul metalic are un unic rol funcțional participînd activ în procesul catalitic, în timp ce fosfataza alcalină din *E. coli* conține patru atomi de zinc per mol de enzimă, doi fiind necesari pentru funcția catalitică și doi pentru menținerea structurii cuaternare (S i m p s o n și V a l l e e, 1968). Alteori, cele două funcții sînt îndeplinite de doi ioni metalici diferiți, ca în cazul α-amilazei din *B. subtilis*, care conține Ca^{2+} și Zn^{2+} primul participînd efectiv la actul catalitic, cel de-al doilea avînd un rol în dimerizarea monomerilor (V a l l e e și W a c k e r, 1970).

Este interesantă observația că enzime omoloage, izolate din diferite surse biologice, pot fi în unele cazuri metaloenzime tipice, pentru ca în altele — să nu fie implicat vreun ion metalic în stabilizarea și funcția proteinei. Astfel, aldolaza din drojdie, carboxipeptidaza din pancreas,

piruvatcarboxilaza din ficatul puiului de găină și carbonic anhidraza eritrocitară sînt metaloenzime tipice, în timp ce aceleași enzime izolate din țesutul muscular de iepure, din citrice și respectiv din diferite plante nu conțin ioni de metale în structura lor. Aceste activități și specialități analoage sînt realizate de enzime, care diferă în structura chimică a întregii macromolecule și a situsului lor catalitic activ.

În cazul enzimelor ce conțin în structura lor același ion metalic, dar care au activități catalitice diferite, specificitatea de acțiune și de substrat este în funcție nu numai de ionul metalic ci și de natura chimică a apoenzimei și a liganzilor.

Astfel, carbonic anhidraza din eritrocitele bovinelor, fosfaza alcalină din *E. coli* și *L*-carboxipeptidaza bovină sînt toate zinc-enzime, dar prima leagă ionul metalic prin intermediul unui rest de cisteină (Rickli, Edsall, 1962), a doua printr-unul de histidină (Lipscomb și al., 1966), iar ultima enzimă prezintă un situs tridentat de legare a zincului, format din resturi de acid glutamic, histidină și lizină (T a i t și V a l e e, 1966).

V a l l e e și W a c k e r (1970) pe baza studiului constantelor de stabilitate a complecșilor pe care unele metale îi pot forma cu enzimele propun clasificarea lor în două categorii: *complexe metal-enzimă* (corespunzător enzimelor activate de metale) și *metaloenzime propriu-zise*.

V a l l e e (1955) a propus pentru stabilirea deosebirilor dintre metaloenzime și enzimele activate de metale nouă criterii parametrice (tabelul 7.2).

TABELUL 7.2

Deosebirile dintre metaloenzime și enzimele activate de metale (după V a l l e e)

P a r a m e t r u	*Metaloenzimă*	*Enzimă activată de metal*
Legarea metalului de proteină	puternic, ireversibil, Me nu este separat prin dializă	labil, ușor reversibil, separabil prin dializă
Constanta de disociere	virtual, zero	măsurabilă
Raport specific Me : apoenzimă	constant, număr mic ce crește în timpul purificării enzimei	variabil
Raport specific Me : cofactor	constant, număr mic	variabil
Raport specific Me : activitate specifică	constant	variabil
Specificitate pentru metal	foarte înaltă	ionii similari pot substitui
Natura metalelor implicate	Zn, Cu, Fe, Mo, Mn	virtual toate metalele din tabelul periodic
Efectul conținutului în metal asupra activității (S, E, *p*H constante)	direct proporțional	cinetică M i c h a e l i s modificată
Activitatea în absența metalului	nulă	scăzută

Cea mai reprezentativă clasă a metaloenzimelor este cea a fier-enzimelor. Aici sînt înglobate atît *fier-flavinenzimele* (xantin oxidaza, aldehid oxidaza, NADH-dehidrogenaza și succinat dehidrogenaza), *fier-hemoenzimele* (catalaza, peroxidaza și citocromii), *dioxigenazele* (catecol-2,3-dioxigenaza, catecol-1,2-dioxigenaza și protocateucat-3,4-dioxigenaza) precum și *feredoxinele* și *rubredoxinele*, enzime cu mase moleculare mici.

Toate metalo-flavinproteinele sînt dehidrogenaze care acționează asupra unei mari varietăți de acceptori de hidrogen. S-a demonstrat că metalul este necesar numai pentru reducerea unui anumit tip de acceptori. Prin îndepărtarea metalului aceste enzime își pierd puterea de a reacționa cu acceptori de tipul citocromului *c*, a fericianurei sau nitratului, dar capacitatea lor de a reduce O_2, coloranții, chinonele sau coenzimele rămîne intactă. Deci metalul nu este implicat în procesul activării donorului de hidrogen.

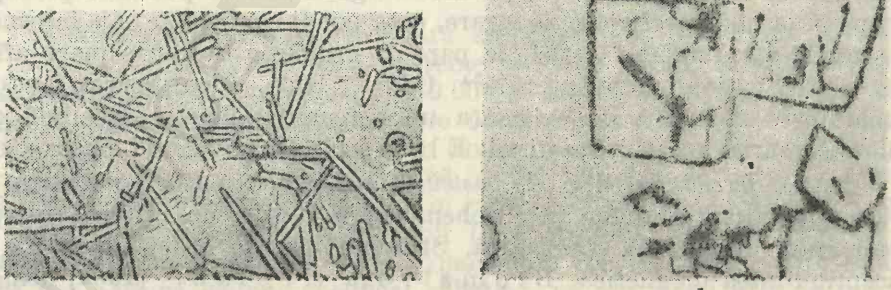
7.5.1 Xantinoxidaza

Xantinoxidaza din ficatul mamiferelor conține patru atomi gram de fier, doi de molibden și o moleculă de FAD. Prin spectroscopie *RES* au fost identificate semnale generate de prezența în structura enzimei a unei flavinsemichinone și a ionilor Mo^{5+} și Fe^{2+}.

Se pare că reacția de reducere este bifazică: întîi are loc formarea unei semichinone și apoi a $FADH_2$. Molibdenul este, probabil, redus de la Mo^{6+} la Mo^{5+} și în final la Mo^{4+}, deoarece prin reducere completă dispare semnalul RES. Sînt unele dovezi experimentale care par a sugera că și Fe^{3+} este redus, dar sînt insuficient de concludente (H a r t și B r a y, 1967).

7.5.2 Amilazele

Izolate din saliva umană, din *Aspergillus oryzae* și din pancreasul suin sînt calciu-enzime care conțin 1,3 și respectiv 2 atomi de Ca/mol de apoenzimă (fig. 7.7). Prin îndepărtarea cofactorului metalic se pierde



a *b*

Fig. 7.7. *a* — α-amilaza cristalizată din *Aspergillus oryzae*, forma aciculară (× 600), *b* — forma cubică (× 1800), după K r e t o w i t c h, 1974.

activitatea catalitică și apar fenomenele caracteristice denaturării proteinelor (Vallee, Stein, Sumerwell, Fischer, 1959). Amilazele din *B. subtilis* mai conțin în plus și 0,5 atom gram de zinc per mol enzimă. Aici, Zn^{2+} servește la dimerizarea a două subunități monomere fără afectarea activității.

7.5.3 Enolaza

Enolaza din drojdie este o *magneziu-enzimă* formată din două subunități inactive din punct de vedere catalitic, de aproximativ 34 000 daltoni. Din studii cinetice și din modificările de fluorescență care apar la adiția Mg^{2+} enzimei disociate inactive, s-a putut conchide că ionul metalic se combină mai întîi cu o subunitate proteică, induce modificări ce au ca rezultat creșterea afinității pentru cea de-a doua subunitate (Brewer și Weber, 1968).

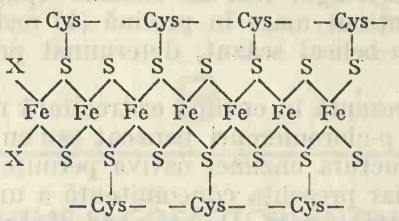
7.5.4 Catalaza

Este o fier-hemoproteină, universal întîlnită în celulele organismelor vegetale și animale. Enzima are o structură agregată, formată din 18 lanțuri polipeptidice, cu o masă moleculară de 14 000 fiecare. Catalaza conține patru resturi de hem per moleculă și deci și patru atomi de fier. În cursul reacției de oxido-reducere, în care o moleculă de H_2O_2 reprezintă donorul de hidrogen, iar cea de-a doua moleculă-acceptorul, Fe^{3+} nu suferă o reducere la Fe^{2+}, el avînd un rol ipotetic de legare a celei de-a doua molecule de substrat (Deisseroth și Dounce, 1970). Deși este una din primele enzime a cărei activitate catalitică a fost pusă în evidență și au fost efectuate nenumărate studii în scopul caracterizării ei, mecanismul de acțiune al acestei enzime nu este încă pe deplin elucidat. Mai mult, în literatură sînt date contradictorii privind natura chimică a situsului de legare a celei de-a doua molecule de H_2O_2.

Deși în structura metaloenzimelor intră un număr mic de metale care sînt puternic legate la un număr limitat de situsuri specifice, nu s-au putut stabili reguli pentru relația metal-ligand dar se pot face presupuneri pe baza unor preferințe de legare, care pot fi confirmate sau infirmate de studiile aprofundate. Astfel, se pare că grupările tiol au o mare afinitate pentru cationii bivalenți: Zn^{2+}, Cd^{2+} și Hg^{2+}. Identificarea acestor grupări este facilitată de existența unor reactivi chimici specifici, ca: p-cloromercuribenzoatul, reactivul Ellman, reactivul Cleland etc.

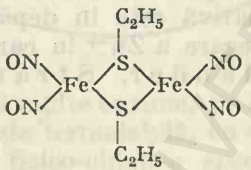
Astfel, *feredoxina* din *Cl. pasteurianum* are o masă moleculară de 6 000, șapte atomi gram de Fe^{3+} nehemic, opt resturi de cisteină și șapte atomi gram de sulfură anorganică. Studiind efectul Mössbauer și susceptibilitatea magnetică, Blömstrom și colab. (1964) demonstrează că în structura feredoxinei, cei șapte atomi de fier sînt în stare ferică, dar că ei există în două medii, structural neechivalente. Coroborînd

aceste rezultate cu cele obținute din studiile chimice a fost propus următorul model pentru situsul activ al feredoxinei:

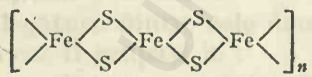


unde *X* este ionul carboxil sau apa, în care cei șapte atomi de fier ai feredoxinei sînt aranjați liniar, legați între ei prin intermediul punților disulfurice ale resturilor de cisteină și a atomilor de sulfură anorganică.

S-a stabilit similitudinea unor proprietăți fizice, în special caracteristice cristalografice, între acest situs activ postulat pentru feredoxină și structurile stabilite prin studii cu raze *X* pentru compusul roșu al lui Roussin,



și pentru $KFeS_2$ polimeră,



În toți acești compuși distanța Fe-Fe este de 2,7Å, ceea ce conduce la o puternică interacțiune covalentă între atomii de fier, ceea ce facilitează transportul de electroni prin catena laterală.

7.5.5 Carbonic anhidraza

Carbonic anhidraza eritrocitară se găsește sub trei forme distincte *A*, *B* și *C*. Toate formele sînt proteine incolore, stabile și solubile, au o masă moleculară de aproximativ 30 000 și conțin un atom de zinc ferm legat la fiecare moleculă, care este absolut necesar pentru activitatea enzimatică. Forma *B* se găsește în concentrații mai mari decît formele *A* și *C*, dar ultima este cea mai activă. Astfel, numărul de turnover pentru hidratarea bioxidului de carbon, în cazul carbonic anhidrazelor *B* și *C* la *p*H 5 și 25°C este de 20 000 moli (mol enzimă)$^{-1}$ (s^{-1}) și respectiv de 600 000 mol (mol enzimă)$^{-1}$ (s^{-1}). Apariția în corpul uman a trei enzime care pot acționa asupra aceluiași substrat, cu activități atît de diferite (1: 30) este neobișnuită, rolul fiziologic posibil al acestei heterogenități moleculare rămîne încă necunoscut.

Studiul compoziției în aminoacizi a carbonic anhidrazei *B* și *C* a arătat că ele conțin 260 resturi de aminoacizi, așezați într-un singur lanț polipeptidic, conțin un singur rest de cisteină (punțile disulfurice sînt absente) și au un conținut mare în prolină (17 resturi) ceea ce explică, probabil, conținutul α-helical scăzut, determinat prin studii de dispersie rotatorie optică.

Gruparea SH prezentă în enzima eritrocitară umană nu este detectabilă prin titrare cu *p*-cloromercuri benzoat sau cu ioni de Ag^+ îndepărtarea zincului din structura enzimei native permite titrarea acestei grupări cu ioni de Ag^+, iar prezența concomitentă a ureei o face reacționabilă și cu *p*-cloromercuribenzoat. De asemenea Co^{2+}-carbonic anhidrazele (în care zincul a fost înlocuit de cobalt) posedă activități enzimatice și proprietăți spectrale similare ceea ce dovedește că coordinarea metalului se face similar la toate speciile moleculare. Deoarece carbonic anhidrazele bovine nu conțin cisteină, asemănările stucturale par a exclude posibilitatea că gruparea SH este cea care leagă cofactorul metalic chiar la formele eritrocitare umane. Studii realizate prin metoda de difracție a razelor *X*, coroborate cu cercetarea acțiunii unor substanțe organomercurice, arată că această grupare SH poate constitui un al doilea situs de legare a Hg^{2+}, cînd în enzima nativă este în depărtat zincul. Atomii donori care formează situsul de legare a Zn^{2+} în carbonic anhidraza nativă nu sînt încă cunoscuți (T i l a n d e r, S t r a n d b e r g, F r i d b o r g, 1965).

8

COENZIME ȘI COFACTORI ENZIMATICI

În structura celor mai multe enzime, pe lîngă componenta proteică, denumită *apoenzimă*, care este termolabilă, cu o masă moleculară mare și posedă toate proprietățile fizico-chimice specifice proteinelor, se întîlnește și o componentă de natură organică, termostabilă, cu o masă moleculară mică, denumită *cofactor enzimatic*.

În funcție de tăria legăturii dintre cele două componente, cofactorii enzimatici, la rîndul lor, pot fi grupați în :

— *grupări prostetice*, substanțe organice fixate pe moleculele aceluiași tip de apoenzimă și care nu pot fi separate de acestea ; grupările prostetice sînt legate stabil de apoenzimă, formînd cu anumite regiuni ale polipeptidei, situsul activ al enzimei ;

— *coenzime*, substanțe organice ce pot trece de la o apoenzimă la alta, de care se pot separa relativ ușor prin dializă ; coenzimele nu reprezintă un component stabil al situsului enzimatic. Ele participă la reacții de transfer, făcînd legătura activităților diferite a două enzime și formînd un sistem : o enzimă transferă o anumită grupare de la un substrat la coenzimă, cealaltă o transferă de la coenzimă la cel de-al doilea substrat ;

— *activatori*, substanțe nespecifice (ioni metalici, agenți reducători tori etc.) care mediază trecerea enzimei dintr-o stare inactivă (zimogen) într-o stare catalitic activă.

Nu totdeauna este posibilă o strictă delimitare între coenzime și grupări prostetice, pe de o parte, și între cofactori și substrat, pe de alta. Dacă există exemple tipice de coenzime (NAD^+, $NADP^+$), sau de grupări prostetice (piridoxal-5′-fosfat), în cazul unor flavinenzime, cofactorul poate fi puternic legat de apoenzimă, asemenea unei grupări prostetice (lipoamid dehidrogenaza EC 1.6.4.3) sau legat, labil, asemenea unei coenzime (D-aminoacid oxidaza ; EC 1.4.3.3).

În cazul unor reacţii enzimatice succesive, de exemplu într-un sistem enzimatic, cu toate că în cele din urmă cofactorul enzimatic se reface în forma lui iniţială el poate deveni într-una din etape substrat al unei reacţii enzimatice. În această situaţie nu se poate face o delimitare netă a noţiunilor de cofactor enzimatic şi substrat al reacţiei enzimatice.

Studiul naturii chimice a *coenzimelor* şi *cofactorilor enzimatici* a demonstrat că majoritatea acestora sînt *vitamine* sau *derivaţi ai vitaminelor* (esterul pirofosforic al tiaminei, riboflavina, amida acidului nicotinic, derivaţi fosforilaţi ai piridoxinei, derivaţi ai ciancobalaminei, acid pantotenic, acid folic, biotina, acid lipoic, acid ascorbic şi alţii) şi *derivaţi fosforilaţi ai nucleozidelor*. Prin prisma rolului pe care vitaminele îl îndeplinesc în reacţiile enzimatice se pot înţelege şi interpreta importanţa şi locul lor în asigurarea activităţii biochimice la nivel celular.

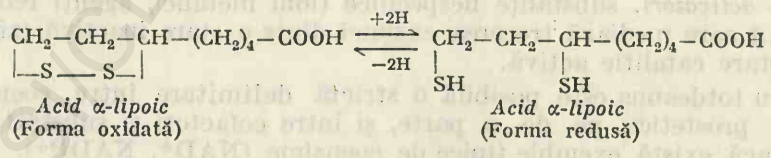
În funcţie de structura lor chimică coenzimele pot fi clasificate în următoarele categorii: coenzime de natură alifatică; coenzime de natură aromatică; coenzime de natură heterociclică; coenzime de natură nucleozidică şi nucleotidică.

8.1. COENZIME DE NATURĂ ALIFATICĂ

Din categoria coenzimelor alifatice fac parte acidul lipoic şi glutationul.

8.1.1. Acidul lipoic

Acidul lipoic a fost descoperit în anul 1941, concomitent în mai multe laboratoare, la început ca factor de creştere a protozoarului *Tetrahymena galeii* (proteina *A* sau factor II), apoi ca factor care înlocuieşte acidul acetic pentru creşterea *Lactobacillus casei* şi stimulează creşterea lui *Streptococcus lactis* în absenţa acetatului şi, ulterior, ca factor al decarboxilării oxidative a acidului piruvic la *Streptococcus faecalis*. Studiul acestor substanţe a demonstrat că ele sînt identice şi reprezintă de fapt o singură substanţă, acidul α-lipoic. Comportarea polarografică şi spectrul în infraroşu sugerează că acidul lipoic este o disulfură ciclică a acidului dimercapto-n-octanoic:



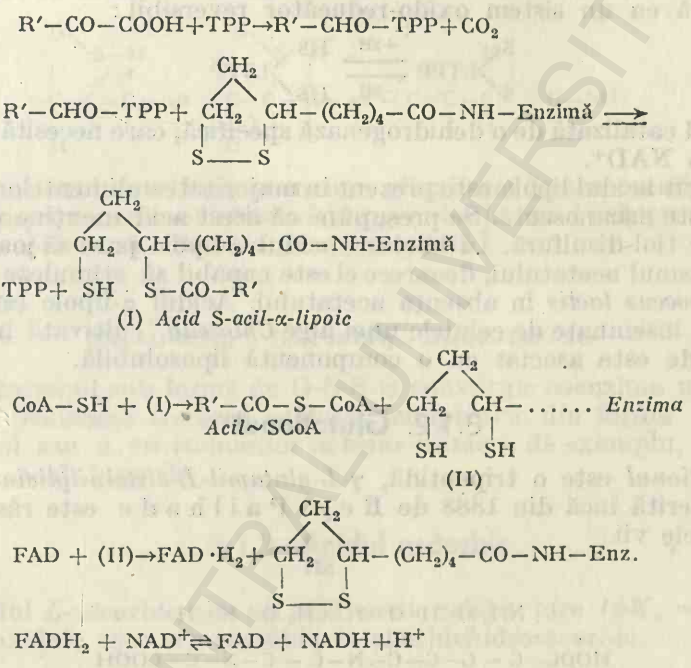
Acid α-lipoic (Forma oxidată) — *Acid α-lipoic* (Forma redusă)

Sub formă oxidată acidul α-lipoic are o coloraţie gălbuie şi un spectru de absorbţie caracteristic la 335 nm, care este condiţionat de prezenţa pentaciclului. Forma redusă a acidului α-lipoic nu se întîlneşte în stare liberă în ţesuturile animale, vegetale şi în microorganisme.

Acidul α-lipoic are un atom de carbon asimetric şi în natură se întîlneşte sub forme izomere, forma biologic activă fiind numai izomerul (+) α-lipoic, dextrogir. Acidul α-lipoic a fost obţinut şi din ţesutul hepatic sub formă cristalizată.

Studii ale distribuţiei acidului lipoic în ţesuturile animale, vegetale şi în celula bacteriană au arătat că el apare în ţesuturi asociat cu proteinele printr-o legătură covalentă care se formează între gruparea lui carboxil şi gruparea ε-amino a unui reziduu lizinic. Din acest complex, acidul lipoic nu poate fi extras cu apă sau cu solvenţi oganici; separarea lui se poate realiza numai printr-o hidroliză parţială cu acid performic sau prin acţiunea unor enzime proteolitice. În acest caz în mediul de reacţie se eliberează o tripeptidă cu structura Ala-Lys-Asp.

Rolul biologic al acidului lipoic este asigurat de prezenţa unor legături disulfidice intramoleculare. Astfel, acidul lipoic este implicat într-o serie de reacţii de decarboxilare oxidativă a α-cetoacizilor.



În celulă acidul α-lipoic participă la procesele de acetilare, în fotosinteză şi, probabil, în ciclul vizual. El a fost identificat în sistemul piruvat dehidrogenazei sub formă legată cu proteina, din care poate fi eliberat de o enzimă prezentă în celulele de *S. faecalis* cultivate pe un mediu lipsit de acid lipoic. Complexul acid lipoic-proteină mediază, în prezenţa piruvatului, formarea *acilfosfatului*, bioxidului de carbon şi a acidului dihidrolipoic liber.

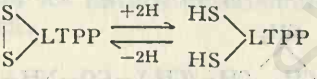
Complexul dehidrogenazei acidului α-cetoglutaric, izolat din inima de porc, catalizează în prezenţa acidului α-lipoic oxidarea reversibilă a NADH+H+. În acest caz *lipoicoamida* este mult mai activă decît acidul liber. Ionii de arseniu şi cadmiu inhibă oxidarea α-cetoglutaratului, deoarece ei pot reacţiona cu grupările tiol libere.

Complexul de dehidrogenare a piruvatului şi α-cetoglutaratului izolat din celulele de *E. coli* conţine 40 şi respectiv 11 moli de acid lipoic legat şi 13 şi respectiv 10 moli de FAD la un mol de proteină. Ambele componente, acidul lipoic legat şi FAD, sînt necesare atît pentru oxidarea piruvatului şi α-cetoglutaratului în prezenţa NAD^+ ca acceptor de hidrogen, cît şi pentru oxidarea piruvatului cînd acidul α-lipoic liber sau amida lui îndeplinesc rolul de acceptor de electroni. Aceste date sugerează faptul că flavina (FAD) este asociată în aceşti complecşi cu hidrogenaza dihidrolipoică, transferul de electroni realizîndu-se după schema :

Piruvat (α-cetoglutaric) → Acid lipoic sub formă legată → FAD → → NAD^+ (sau acid lipoic liber).

Dehidrogenaza dihidrolipoică a fost izolată şi purificată din *E. coli* şi este o flavoproteină cu masă moleculară de 88 000.

Forma biologic activă a acidului lipoic în decarboxilarea piruvatului este *lipotiamidpirofosfatul* (v. pag. 325). Lipotiamidpirofosfatul (LTPP) funcţionează ca un sistem oxido-reducător reversibil :

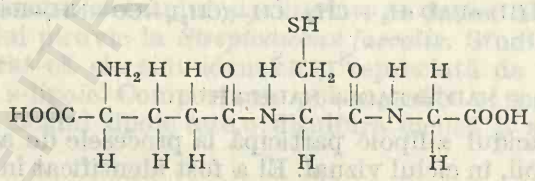


reacţia fiind catalizată de o dehidrogenază specifică, care necesită prezenţa în mediu a NAD^+.

Întrucît acidul lipoic este prezent în majoritatea alimentelor, carenţa lui la om este necunoscută. Se presupune că acest acid menţine echilibrul intracelular tiol-disulfură. În bacterii acidul α-lipoic pare să joace un rol în metabolismul acetatului, deoarece el este capabil să stimuleze creşterea lui *Streptococcus lactis* în absenţa acetatului. Acidul α-lipoic este produs în cantităţi însemnate de celulele unei alge *Chlorella*, cultivată în condiţii aerobe, unde este asociat cu o componentă liposolubilă.

8.1.2. Glutationul

Glutationul este o tripeptidă, *γ-L-glutamil-L-cisteinilglicina*, care a fost descoperită încă din 1888 de R e y - P a i l h a d e este răspîndit în toate celulele vii.



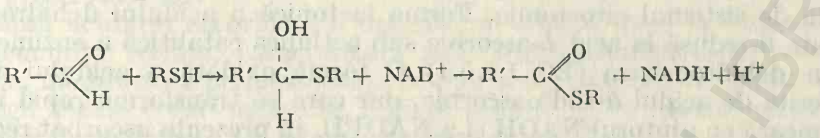
Gruparea funcţională a glutationului este gruparea tiol. Glutationul redus (GSH) este oxidat enzimatic, în prezenţa acidului dehidroascorbic, sub acţiunea glutation dehidrogenazei (EC 1.8.5.1). Glutationul oxidat (G-S-S-G) este redus enzimatic de NAD^+ sau $NADP^+$, în prezenţa glutation reductazei (EC 1.6.4.2).

Deoarece glutationul suferă reacţii de oxidare şi reducere enzimatice, el îndeplineşte un rol important în reacţiile de oxido-reducere din celule.

Glutationul intră într-o reacţie reversibilă cu cisteina

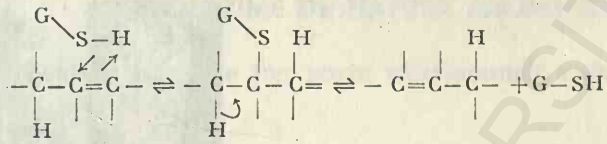
$$2GSH + Cys\text{-}S\text{-}S\text{-}Cys \rightleftharpoons GSSG + 2Cys\text{-}SH$$

reacție catalizată de enzima glutation-homocistin transhidrogenaza (EC 1.8.4.1). În unele reacții enzimatice glutationul îndeplinește rolul de coenzimă specifică. Această coenzimă mediază și unele reacții ale tiolilor cu aldehidele, cînd în urma reacției glutationului cu carbonilul aldehidic se formează un compus hemitioacetalic. Enzimele care utilizează glutationul drept coenzimă catalizează reacția mai departe pînă la formarea tiolesterului corespunzător :

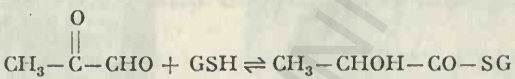


Hemitioacetal

În prezența unor enzime, glutationul catalizează izomerizarea dublelor legături în molecula olefinelor :



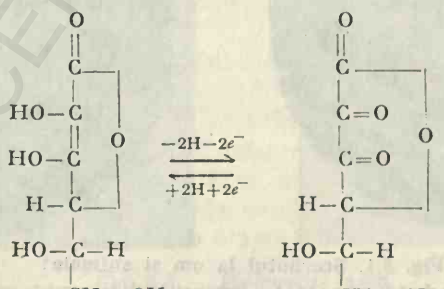
Glutationul constituie coenzima glioxilazei I care catalizează reacția de transport intramolecular a hidrogenului în cazul reducerii metilglioxalului la acid lactic. Reacția este reversibilă



Glutationul sub formă de G-S-S-G constituie coenzima unor izomeraze care realizează trecerea acidului fenilpiruvic din forma lui ceto în forma enol sau a *cis*-izomerilor în *trans*-izomeri, de exemplu, a acidului maleic în acid fumaric.

8.1.3. Acidul ascorbic

Acidul *L*-ascorbic este un acid enolic relativ tare ($pK_a = 4{,}17$) care poate fi oxidat, ușor și reversibil, la acid dehidroascorbic.



Acid L-ascorbic *Acid dehidroascorbic*

Potențialul redox al acidului *L*-ascorbic este situat între cel al piridinnucleotidelor și cel al citocromului *c*, și are o valoare comparabilă cu cea a glutationului ceea ce a sugerat faptul că acest compus cu acțiune vitaminică acționează la nivel celular în calitate de transportor de hidrogen.

În organismele vegetale, enzima ascorbat oxidaza (EC 1.10.3.3) realizează cataliza reacției de oxidare a acidului *L*-ascorbic; la organismele animale, această enzimă lipsind, oxidarea acidului *L*-ascorbic este realizată de sistemul citocromic. Forma lactonică a acidului dehidroascorbic poate fi redusă la acid *L*-ascorbic sub acțiunea catalitică a enzimei glutation dehidrogenaza (EC 1.8.5.1). O formă oxidată a acidului ascorbic, diferită de acidul dehidroascorbic, dar care se transformă rapid în el, se formează cu ajutorul NADH și a NADPH, în prezența ascorbat reductazei oxidate (EC 1.6.5.4). Din aceste exemple reiese clar că acidul ascorbic acționează ca un *transportor biologic de hidrogen*. Faptul că acest compus este universal răspîndit în diferite țesuturi animale și, cu excepția omului

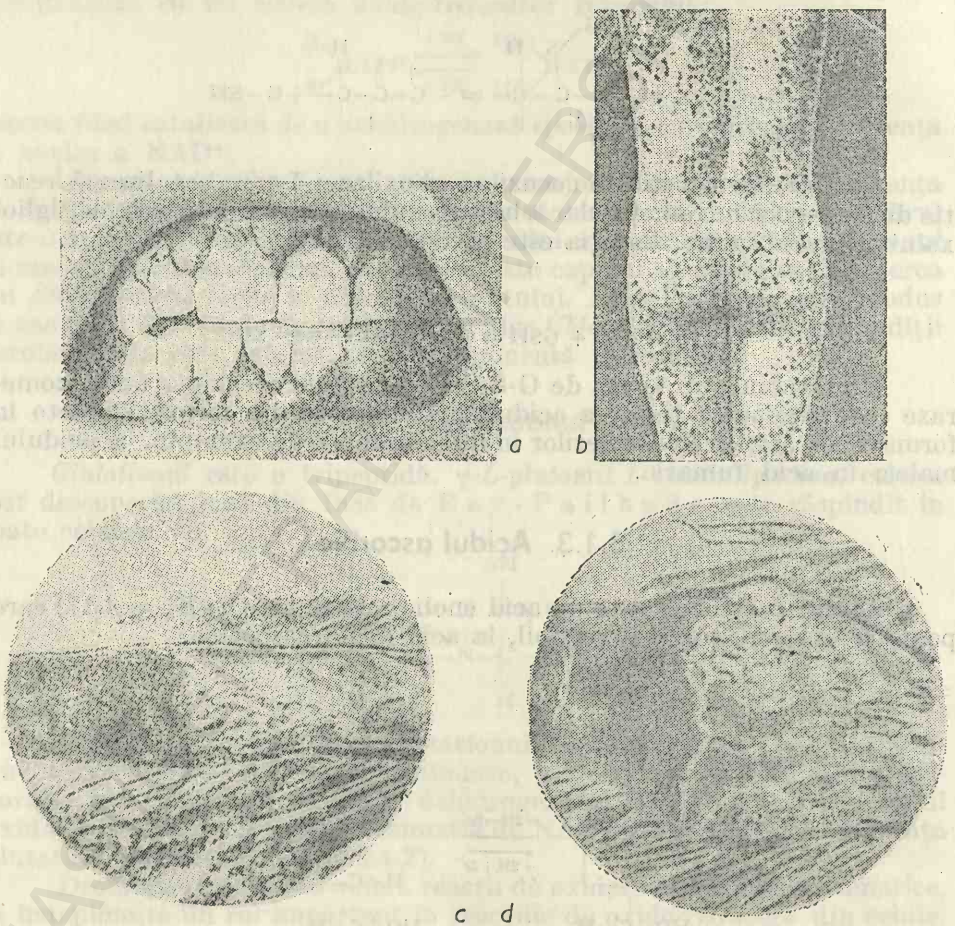


Fig. 8.1. Scorbutul la om și animale:

a — modificări la nivelul gingiilor, după P r e s c o t t; *b* — hemoragii locale pe suprafața corpului (după B u k i n). Scorbutul la cobai; *c* — aspectul normal al unei coaste de la un animal sănătos; *d* — modificări la nivelul articulațiilor costale la un animal cu scorbut.

primatelor și cobaiului, celelalte organisme animale îl pot sintetiza dă indicații asupra rolului important pe care acest acid îl poate juca în metabolismul animal.

Fiind un bun agent de reducere, acidul ascorbic, asemenea glutamatului, poate juca un rol deosebit de important în menținerea activității SH-enzimelor. Uneori „in vitro" se adaugă în preparatele enzimatice în scopul prezervării lor.

Lipsa acidului ascorbic din organismul animal duce la instaurarea bolii denumită *scorbut*, caracterizată prin fragilitatea pereților vaselor sanguine, modificarea permeabilității acestora și, îndeosebi a capilarelor, hemoragii locale (țesut muscular, organe interne) și la nivelul gingiilor, modificări degenerative ale odontoblastelor și osteoblastelor, ale dentinei și oaselor, însoțite de carii dentare, căderea dinților, fracturarea oaselor etc. modificări în formarea colagenului ș.a. (fig. 8.1).

8.2. COENZIME DE NATURĂ AROMATICĂ

Din această categorie fac parte ubichinonele care sînt descrise în capitolul 12.

8.3. COENZIME DE NATURĂ HETEROCICLICĂ

8.3.1. Coenzime — derivați ai tiaminei, vitaminei B_1 sau aneurinei

Tiamina, *vitamina* B_1 sau aneurina este un factor *nutritiv deosebit* de important și *lipsa ei din organism determină* la animale maladia cunoscută sub denumirea de *polinevrită*, iar la om — *beri-beri*, boli însoțite de *degenerarea sistemului nervos periferic și de paralizia membrelor* (fig. 8.2).

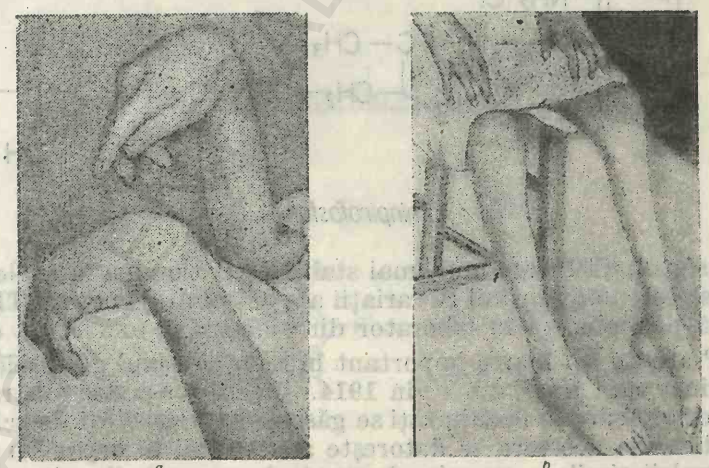
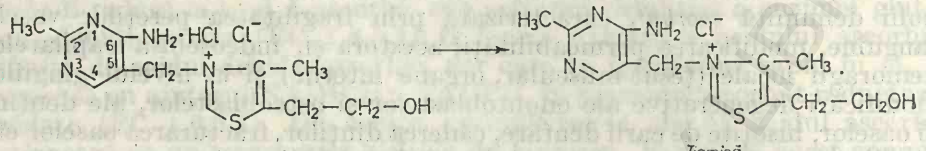
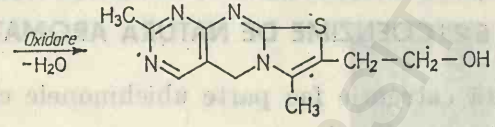


Fig. 8.2. — Polinevrita la om.
a—contractarea membrelor superioare (după Bignell și Prescott); *b*—atrofia membrelor inferioare cu contractarea labei piciorului (după Bukin).

Tiamina din alimente este distrusă parțial în cursul prelucrării culinare. În soluții bazice tiamina este instantaneu transformată într-un produs de culoare galbenă, cu o fluorescență albastră. Oxidarea ei cu bioxid de mangan, $KMnO_4$ sau cu $K_3[Fe(CN)_6]$ este însoțită de formarea unui produs - *tiocromul* - substanță cu o intensă fluorescență albastră direct proporțională cu cantitatea de tiamină redusă (reacția se utilizează pentru dozarea cantitativă a vitaminei) :



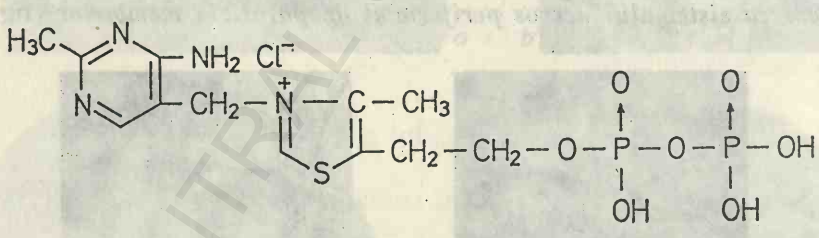
Clorhidrat de tiamină *Tiamină*



Tiocrom

După A l e x a n d e r , cea mai mare parte a tiaminei, prezentă în țesuturile animale, se găsește sub formă de pirofosfat. Mici cantități de mono și trifosfat de tiamină sînt prezente în creier, ficat, inimă și rinichi de șobolan, organul cel mai bogat în tiaminpirofosfat (TPP) fiind ficatul. Majoritatea tiaminei se găsește sub formă de TPP.

Tiaminpirofosfatul este forma în care tiamina funcționează în calitate de coenzimă. L o h m a n și S c h u s t e r (1957) izolează din drojdia de bere o coenzimă, *cocarboxilaza*, care ulterior s-a dovedit a fi tia-



Tiaminpirofosfatul

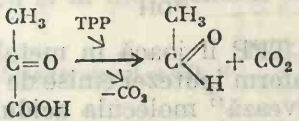
minpirofosfatul. TPP este mult mai stabil decît tiamina la aceleași valori de *p*H, însă este mai sensibil la variații ale *p*H-ului. Structura TPP a fost confirmată prin sinteză în laborator din tiamină și oxiclorură de fosfor.

TPP are un rol foarte important în metabolismul glucidelor, sesizat pentru prima oară de F u n k în 1914. Ulterior s-a demonstrat că în creierul porumbeilor avitaminizați se găsesc mari cantități de acid piruvic și că bradicardia acestora se datorește acumulării în organism a acestui acid. Convulsii similare cu cele observate la porumbeii avitaminizați au fost obținute după injectarea unor porumbei normali cu acid lactic sau acid piruvic. Observații că în avitaminoza B_1 se depistează acumulări

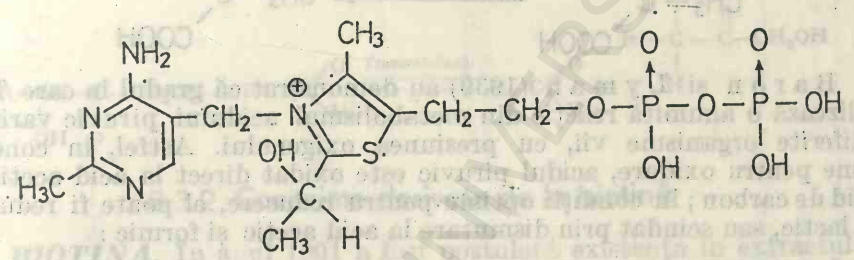
masive de acid lactic, acid piruvic şi alţi cetoderivaţi au condus la concluzia că *tiamina este implicată în metabolismul cetoacizilor*, în general, şi al acidului piruvic, în special.

Principalele reacţii enzimatice care sînt catalizate cu participarea TPP, în calitate de coenzimă, pot fi grupate astfel:

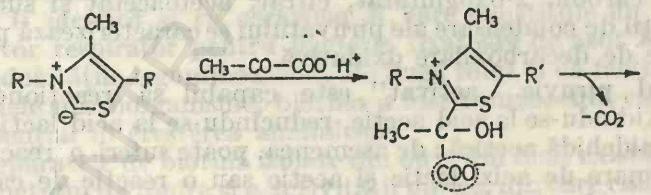
Reacţii de decarboxilare a α-cetoacizilor. Acidul piruvic, de exemplu, sub acţiunea piruvat decarboxilazei (EC 4.1.1.1) este decarboxilat anaerobiotic cu formare de CO_2 şi aldehidă acetică după reacţia:

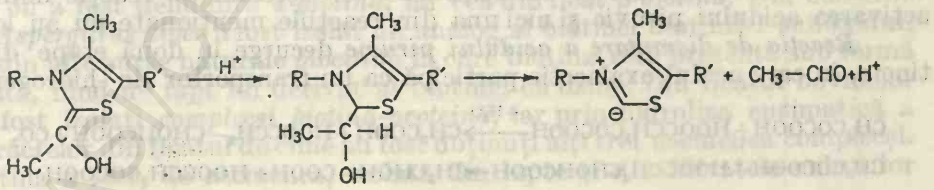


În cursul acestei reacţii, gruparea aldehidică „activă" se leagă la atomul de carbon din poziţia 2 a inelului tiazolic, formînd *acetaldehida activă.*



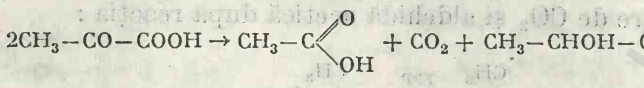
Breslow (1958), Breslow şi Mc Nelis (1959) explică formarea acetaldehidei printr-un mecanism în care tiamina formează un amfiion stabil, la nivelul nucleului tiazolic, care condensează cu gruparea carbonil:



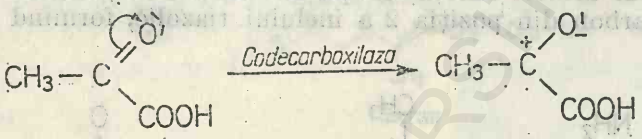


Această explicaţie dată mecanismului de reacţie la care participă TPP a fost verificată şi confirmată în studiile efectuate pe modele enzimatice diverse.

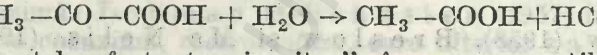
Produsul reacției dintre TPP și acidul piruvic, 4-hidroxietiltiaminpirofosfat, a fost sintetizat de Krampitz și alții, și a fost izolat din microorganisme și ca produs al reacției dintre tiaminpirofosfat și piruvat (sau acetaldehidă) în prezența carboxilazei germenilor de grîu. Hidroxietiltiaminpirofosfatul este, de asemenea, un compus intermediar în oxidarea piruvatului cu formare de acetilcoenzimă A. Alți autori menționează că TPP ar cataliza o dismutare de tipul :



Rolul precis pe care TPP îl joacă în metabolismul piruvatului nu este pe deplin elucidat. Conform ipotezei emise de Barron și colab. (1939, 1941) tiamina „activează" molecula acidului piruvic de o manieră care poate fi prezentată astfel :



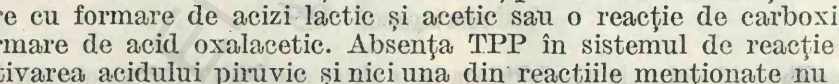
Baron și Lyman (1939) au demonstrat că gradul în care TPP catalizează o anumită reacție din metabolismul acidului piruvic variază, la diferite organisme vii, cu presiunea oxigenului. Astfel, în condiții optime pentru oxidare, acidul piruvic este oxidat direct la acid acetic și dioxid de carbon ; în condiții optime pentru reducere, el poate fi redus la acid lactic, sau scindat prin dismutare la acid acetic și formic :



Experiențele efectuate „in vitro", în care s-au utilizat țesuturi de la animale cu avitaminoză B_1 au demonstrat că adiția de tiamină a accelerat reacțiile de condensare ale piruvatului ce au condus la sinteza de hidrați de carbon, 2-oxoglutarat, citrat, acetoacetat și succinat. Toate aceste reacții de condensare ale piruvatului se caracterizează prin existența unei trepte de decarboxilare oxidativă.

Acidul piruvic „activat" este capabil să reacționeze cu catalizatorul oxidîndu-se la acid acetic, reducîndu-se la acid lactic, decarboxilîndu-se la aldehidă acetică ; de asemenea, poate suferi o reacție de dismutare cu formare de acizi lactic și acetic sau o reacție de carboxilare cu formare de acid oxalacetic. Absența TPP în sistemul de reacție inhibă activarea acidului piruvic și nici una din reacțiile menționate nu au loc.

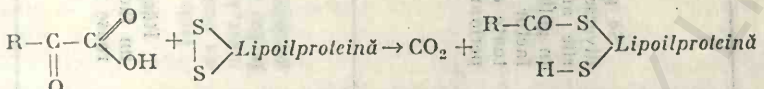
Reacția de dismutare a acidului piruvic decurge în două etape distincte, în care acidul oxalacetic participă ca un transportor de hidrogen :



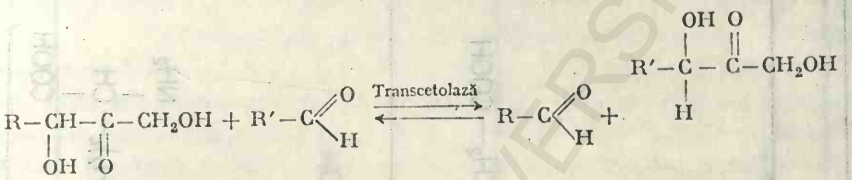
Formarea acidului oxalacetic, precum și faptul că efectul tiaminei asupra consumului de oxigen de către *Staphyloccocus aureus* „avitaminizat", poate fi reprodus cu ajutorul acidului oxalacetic a fost demonstrată prin folosirea $^{14}CO_2$.

Această ipoteză, care nu a fost verificată prin experienţe pe animale, dă o explicaţie corespunzătoare rolului jucat de TPP în metabolism, deoarece acidul oxalacetic, care îndeplineşte funcţia de transportor de hidrogen, participă nemijlocit la sinteza acizilor citric, α-cetoglutaric, succinic, fumaric, malic, glutamic şi aspartic.

Reacţii de decarboxilare oxidativă catalizate de carboxilaza acidului piruvic şi acidului α-cetoglutaric. În compoziţia acestor enzime pe lîngă TPP se întîlneşte şi o grupare prostetică lipoilamidă, care în procesul de decarboxilare oxidativă a α-cetoacizilor îndeplineşte rolul de acceptor intermediar al restului acil şi al hidrogenului care rezultă :



Reacţii de scindare a α-hidroxicetonelor şi dicetonelor. Unele enzime, de exemplu transcetolaza (EC 2.2.1.1) şi fosfocetolazele, conţin în calitate de coenzimă TPP şi sînt capabile să catalizeze, în general, reacţii de tipul :



8.3.2 Coenzime derivate de la biotină

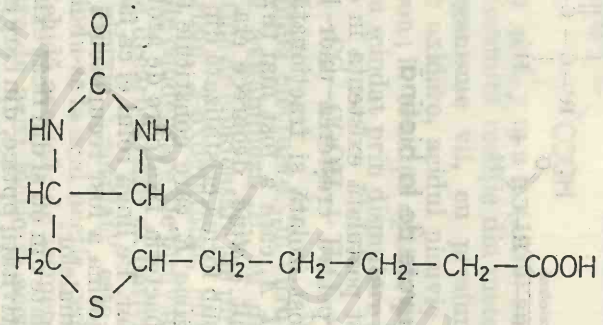
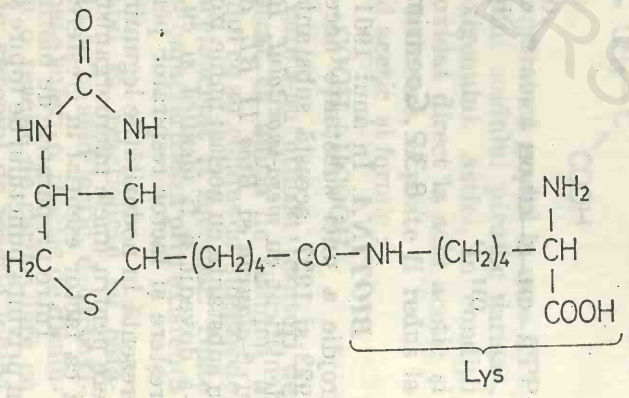
BIOTINA. În anul 1901 a fost postulată existenţa în extractul de drojdie a unei substanţe necesare pentru creşterea unor levuri. Între 1922 şi 1927, această substanţă a fost izolată şi fracţionată în Bios I, identificat cu *meso-inozitolul, Bios II A*, care a fost mai tîrziu omologat cu β-*alanina* şi *Bios II BL*, denumit *biotină*, deoarece era asemănător cu substanţa cu acelaşi nume izolată sub formă cristalizată din ou. *Biotina* s-a dovedit a fi *identică şi cu coenzima R*, care constituie un factor de creştere şi factor respirator pentru bacteria fixatoare de azot *Rhizobium*, prezentă în nodozităţile leguminoaselor. Pe lîngă rolul ei ca factor de creştere pentru unele microorganisme, biotina a fost recunoscută ca vitamină şi ca factor esenţial în creşterea animalelor.

Între preparatele de biotină izolate din ou şi din ficat există deosebiri în privinţa punctului de topire şi a activităţii optice, din care cauză biotina din ou a fost denumită α-*biotină*, iar cea din ficat β-*biotină*. Din culturile de *Aspergillus niger* a fost izolat un analog al biotinei biotinil-1-sulfoxidul, iar din alte surse naturale *biocitina* la care biotina, este prezentă sub formă legată, fiind de fapt un derivat al biotinei cu lizina. Din ficatul bovinelor au fost izolaţi *complecşi biotină-proteină*, iar prin hidroliza enzimatică a extractelor din ficatul de cîine au fost obţinuţi alţi trei asemenea complecşi. Biotina a fost, de asemenea, izolată din lapte şi din filtratele culturilor de *Aspergillus niger*.

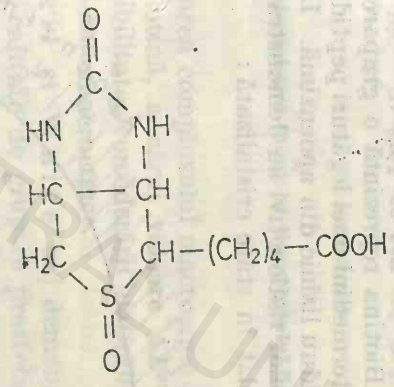
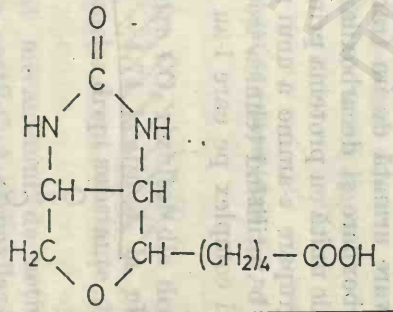
Structură, sinteză şi proprietăţi fizico-chimice. Structura chimică a β-biotinei, α-biotinei, biocitinei au fost stabilite şi confirmate prin sinteză în laborator (tabelul 8.1).

TABELUL 8.1

Structura chimică și răspîndirea biotinei și a substanțelor înrudite ei

Compusul	*Formula structurală*	*Răspîndire și rol biologic*
Biotina		Se găsește în plantele verzi, la diverse microorganisme, în țesuturile animale și îndeosebi în ficat, în gălbenușul de ou etc. Constituie factor de creștere, probabil, pentru toate organismele inferioare și superioare.
Biocitina		Răspîndită în levuri; constituie un factor de creștere pentru numeroase microorganisme.

BCU Cluj / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Biotinsulfoxidul sau factorul AN		Izolat din culturile de *Phycomyces blakesleeanus* și de *Aspergillus niger*, biotinsulfoxidul constituie un factor de creștere pentru microorganismul *Neurospora crassa*.
Oxibiotina		

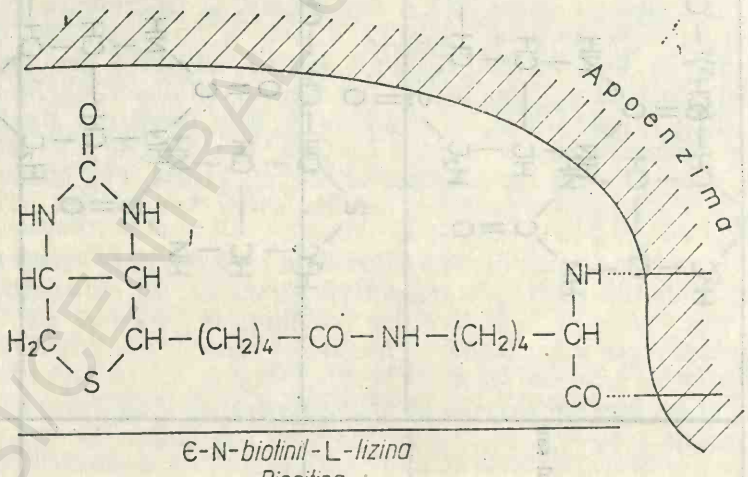
BCU IASI CENTRE UNIVERSITARE LIBRARY

Sinteza β-biotinei a fost realizată de Harris și colab., care au folosit *L*-cisteină și acid cloracetic. Teoretic, cele patru preparate racemice posibile, existența formelor izomere cu configurație *trans* și *cis* este inevitabilă, însă atît β-biotina separată din sursele naturale, cît și dl-biotina sintetică (care posedă 50% din activitatea biotinei naturale) au întotdeauna o configurație *cis*. Ceilalți doi izomeri sintetici dl-alobiotina și dl-epialobiotina au configurație *trans* și sînt biologic inactivi.

Biotina formează cu o mucoproteină din albușul de ou *avidina*, un complex cunoscut sub numele de *biotinavidină*, care a fost separat în stare cristalizată. Avidina conține *hexozamină*, *manoză* și *galactoză* și este un puternic inhibitor al tuturor enzimelor care conțin în calitate de cofactor enzimatic biotină. Complexul biotinavidină este inactiv din punct de vedere biologic, nu este absorbit la nivelul tubului digestiv, nu poate fi scindat prin dializă și este rezistent față de enzimele proteolitice; este însă termolabil.

Deși era cunoscut rolul deosebit de important pe care biotina îl joacă în organismele vii, mecanismele participării ei la reacțiile biochimice și procesele fiziologice au rămas mult timp necunoscute.

Datorită lucrărilor lui Feodor Lynen și colaboratorilor săi s-a stabilit că biotina este *cofactorul reacțiilor enzimatice* în care are loc o activare urmată de un transfer de CO_2, participînd astfel la reacțiile de carboxilare și decarboxilare. Biotina reprezintă o grupare prostetică puternic unită cu proteina prin intermediul unei legături peptidice formate cu o grupare ε-amino a unui reziduu lizinic din apoenzimă. Lynen și colab. utilizînd tehnica izotopilor radioactivi au demonstrat structura acestui complex pe care l-au izolat în stare cristalizată:



ε-N-*biotinil*-L-*lizina*
Biocitina

Carboxilările enzimatice sînt realizate de biotinenzime, care activează CO_2 sau acidul carbonic. Fixarea grupării carboxil este un proces endergonic care are loc numai în prezența ATP.

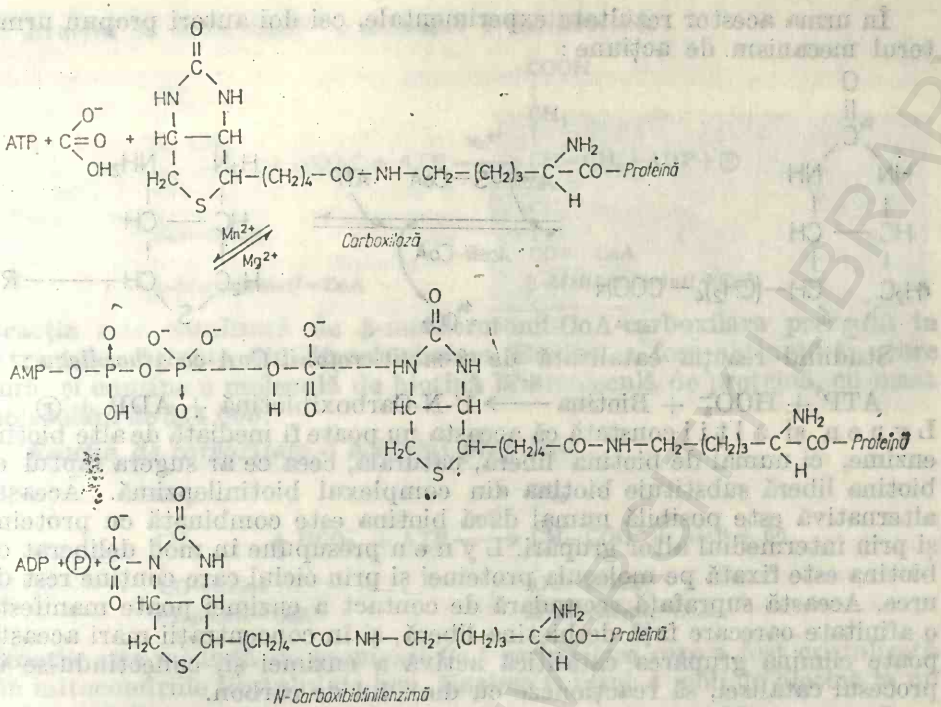
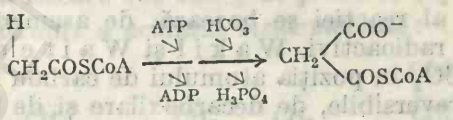


Fig. 8.3 Mecanismul chimic al transportului bioxidului de carbon (după L y n e n)

Formarea complexului macroergic dintre CO_2 rezultat din decarboxilare şi biotină, a cărui valoare $\Delta E^{0\prime} = -4{,}74$ kcal/mol, la pH = 7 creează posibilitatea considerării biotinilenzimelor drept substanţe „bogate în energie" sau macroergice.

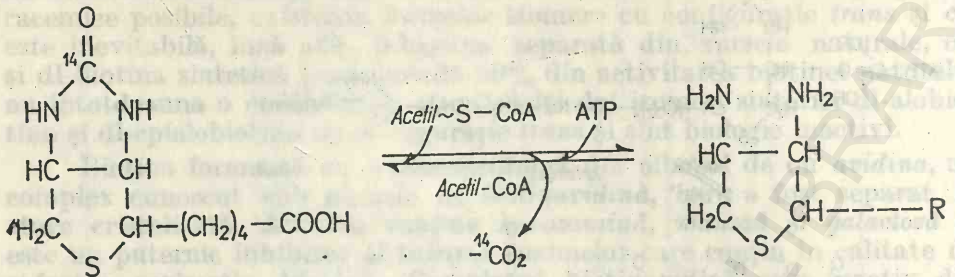
W a k i l şi W a i t e au demonstrat mecanismul de acţiune al biotinei, în calitate de grupare prostetică a acetil-CoA-carboxilazei (EC 6.4.1.2) care catalizează reacţia:



Malonil~SCoA

Tratînd enzima cu ATP, Mn şi $^{14}CO_2$, într-o primă fază autorii au depistat ^{14}C în biotină, care apoi va fi transferat cantitativ la acetil~CoA, rezultînd malonil~CoA. Gruparea prostetică carboxilată, izolată în prima fază, s-a dovedit a fi biotina cu C marcat. Gruparea prostetică, izolată în cursul celei de-a doua faze, a fost identificată ca diaminobiotina.

În urma acestor rezultate experimentale, cei doi autori propun următorul mecanism de acțiune:



Studiind reacția catalizată de *β-metil-crotonil-CoA-cocarboxilaza*:

$$ATP + HCO_3^- + \text{Biotina} \xrightarrow{Mg^{++}} 1'\text{-N-Carboxibiotină} + ADP + Ⓟ$$

L y n e n și a l ț i i constată că aceasta nu poate fi mediată de alte biotinenzime, ci numai de biotina liberă, naturală, ceea ce ar sugera faptul că biotina liberă substituie biotina din complexul biotinilenzimă. Această alternativă este posibilă numai dacă biotina este combinată cu proteina și prin intermediul altor grupări. L y n e n presupune în mod deliberat că biotina este fixată pe molecula proteinei și prin ciclul care conține rest de uree. Această suprafață secundară de contact a enzimei poate manifesta o afinitate oarecare față de biotina liberă, și în concentrații mari aceasta poate elimina gruparea catalitică activă a enzimei și, conectîndu-se în procesul catalizei, să reacționeze cu dioxidul de carbon.

Structura CO_2-biotinilenzimelor a fost elucidată în experiențele în care s-au studiat metodele de fixare a CO_2 în CO_2-biotinilenzimele: β-metilcrotonil-CoA-carboxilaza, propionil-CoA-carboxilaza și metilmalonil-CoA-oxalacetat transcarboxilaza, care sînt legate cu proteina printr-o legătură 1'-N-carboxibiotină. Legătura dintre proteină și biotină în toate cazurile se realizează prin gruparea ε a resturilor lizinei, prezentă în catena polipeptidică.

Unele biotinil-enzime necesită pentru realizarea procesului catalitic prezența în mediu a activatorilor. Astfel, acetil-CoA-carboxilaza de origină animală necesită prezența citratului și izocitratului, iar piruvat-carboxilaza — prezența acetil-CoA. Acești activatori nu participă în însuși procesul de carboxilare. Se presupune că acești activatori influențează asupra conformației moleculei proteice, îndeplinind rolul de reglatori ai catalizei enzimatice.

Acest mecanism al reacției se bazează, de asemenea, pe experiențe efectuate cu izotopi radioactivi, W a k i l și W a i t e depistînd întotdeauna atomul ^{14}C și $^{14}CO_2$ în poziția atomului de carbon ureidic al biotinei.

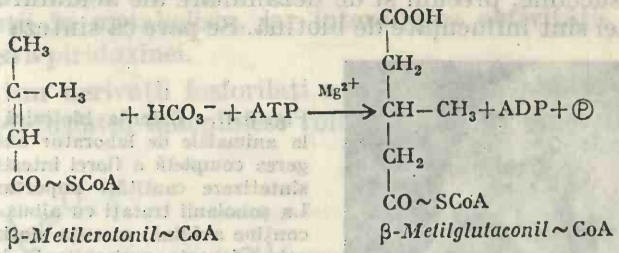
Dintre reacțiile reversibile, de decarboxilare și de fixare a CO_2, care sînt catalizate de enzime ce conțin biotină, cele mai importante sînt:

Reacția de carboxilare a acetatului cu formare de acid malonic:

$$\underset{\substack{|\\ CO\sim SCoA\\ \textit{Acetil}\sim CoA}}{CH_3} + HCO_3^- + ATP \longrightarrow \underset{\substack{|\\ CO\sim SCoA\\ \textit{Malonil}\sim CoA}}{\overset{COOH}{\overset{|}{CH_2}}} + ADP + Ⓟ$$

Reacția este catalizată de acetil-CoA-carboxilaza.

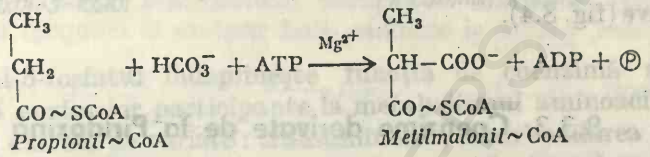
Reacția de carboxilare a acidului β-metilcrotonic:



β-*Metilcrotonil*~CoA — β-*Metilglutaconil*~CoA

Reacția este catalizată de β-metilcrotonil-CoA-carboxilaza prezentă în extractele obținute din *Mycobacterium*. Enzima a fost obținută în stare pură și conține o moleculă de biotină la o moleculă de proteină, cu masa moleculară de 344 000.

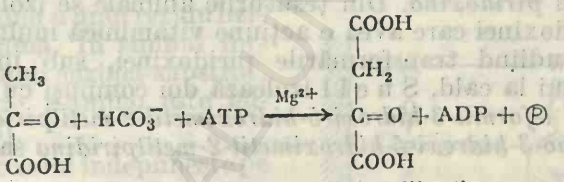
Reacția de carboxilare a acidului propionic:



Propionil~CoA — *Metilmalonil*~CoA

Reacția este mediată de *propionil-CoA-carboxilaza* care a fost cristalizată din mitocondriile ficatului de bou. Enzima conține 4 moli de biotină la un mol proteină.

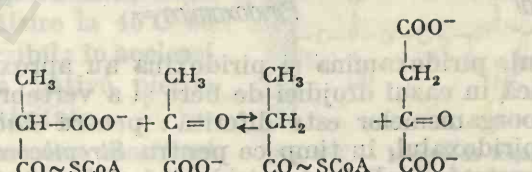
Reacția de carboxilare a acidului piruvic:



Acid piruvic — *Acid oxalilacetic*

Reacția este catalizată de *piruvat carboxilază* larg răspîndită în țesuturile animale, îndeosebi în mitocondriile hepatice și la microorganisme. Piruvat carboxilaza izolată din bacteria *Pseudomonas citronellolis* conține 1 mol de biotină la fiecare 400 000 g de proteină (apoenzimă).

Reacția de carboxilare a acidului metil malonic:



Acid metilmalonic — *Acid propionic* — *Propionil ~ SCoA* — *Acid oxalilacetic*

Reacția este catalizată de o enzimă, *metilmaloniloxalilacetic transcarboxilaza*, izolată din bacteriile fermentației propionice.

Alte reacții enzimatice catalizate de dehidrogenaze, de decarboxilaze ale acidului succinic, precum și de dezaminare ale acidului aspartic, serinei și treoninei sînt influențate de biotină. Se pare că sinteza citrulinei este

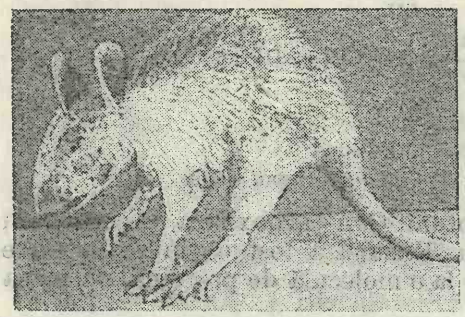


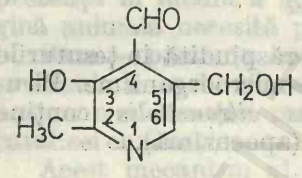
Fig. 8.4. — Carența biotinică a fost obținută la animalele de laborator numai după distrugerea completă a florei intestinale, capabilă să sintetizeze cantități importante de vitamină. La șobolanii tratați cu albuș de ou crud (care conține avidină) carența biotinică se manifestă prin alopecie periorbitară, leziuni ale pielii, dermatite eczematoase, paralizie, spasme ale membrelor posterioare și dermatoză seboreică.

funcție de concentrația biotinei în mediu. Lipsa biotinei din organism are urmări grave (fig. 8.4).

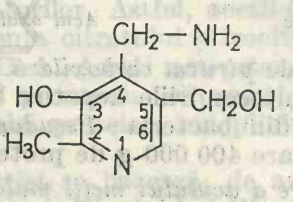
8.3.3. Coenzime derivate de la Piridoxină

Numeroase reacții enzimatice sînt catalizate de enzime care conțin în calitate de coenzime derivați ai piridoxinei sau vitaminei B_6.

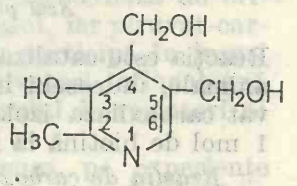
Vitamina B_6 este *2-metil-3-hidroxi-4,5-(dihidroximetil)-piridină*, compus denumit și *piridoxină*. Din țesuturile animale se izolează în 1942 un derivat al piridoxinei care avea o acțiune vitaminică mult mai mare decît piridoxina. Studiind transformările piridoxinei, sub influența $KMnO_4$ și a amoniacului la cald, S n e l l izolează doi compuși cu acțiune vitaminică diferită : *4-formil-3-hidroxi-5-hidroximetil-2-metilpiridina* sau *piridoxalul* și *4-amino-3-hidroxi-5-hidroximetil-2-metilpiridina* sau *piridoxamina*.



Piridoxal



Piridoxamina



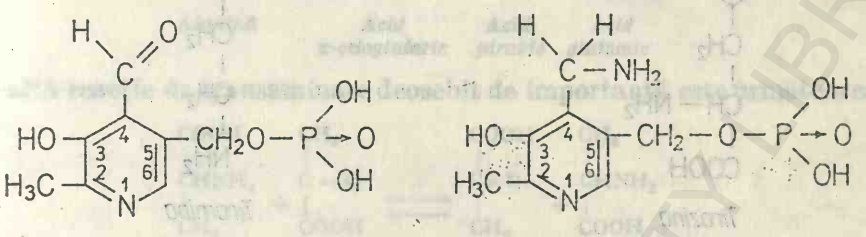
Piridoxina

Piridoxalul, piridoxamina și piridoxina au aproximativ aceeași acțiune vitaminică în cazul drojdiei de bere și a vertebratelor. Influența lor asupra microorganismelor este diferită : pentru *Lactobacillus casei* este mai eficace piridoxalul, în timp ce pentru *Streptococcus faecalis* rolul de vitamină B_6 este îndeplinit de piridoxină. Din acest motiv se vorbește adesea de vitaminele B_6.

Piridoxalul și piridoxamina sînt formele vitaminei mult mai instabile, îndeosebi în soluții alcaline și la cald, decît piridoxina. Ambele forme sînt distruse în mediu acid în prezența luminii. Toate cele trei forme ale vita-

minei B_6 sînt distruse de agenţi oxidanţi (acidul azotic, la 100°C) $KMnO_4$ şi H_2O_2 la temperatura camerei şi de radiaţiile ultraviolete — şi îndeplinesc diferite funcţii în metabolism, iar intensitatea activităţii biologice este diferită de cea a piridoxinei.

În organism derivaţii fosforilaţi ai piridoxinei, piridoxal-5-fosfatul şi piridoxamin-5-fosfatul îndeplinesc rolul de grupări prostetice.



Piridoxal-5-fosfat *Piridoxamin-5-fosfat*

Piridoxal-5-fosfatul îndeplineşte funcţia de coenzimă sau grupare prostetică a enzimelor participante la metabolismul aminoacizilor, catalizînd reacţii extrem de variate: transaminarea, decarboxilarea şi racemizarea aminoacizilor, condensarea indolului şi a serinei cu formare de triptofan, α, β-deshidratarea serinei, β,γ-desulfurarea homocisteinei, formarea serinei din glicină etc.

Piridoxal-5-fosfatul se leagă printr-un sistem de baze Schiff cu gruparea ε-amino a unui rezidu lizinic din apoenzimă. În timpul formării complexului enzimă-substrat, această grupare ε-amino este eliberată (fig. 8.5).

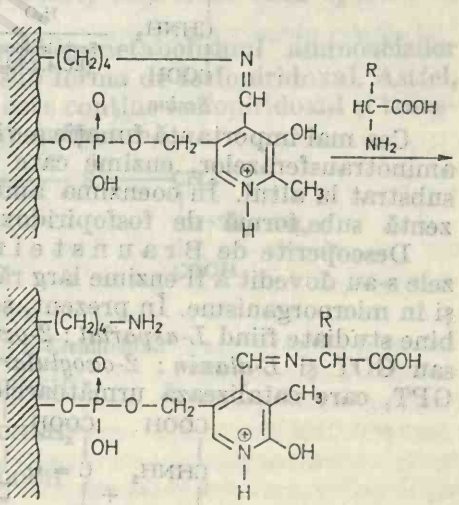
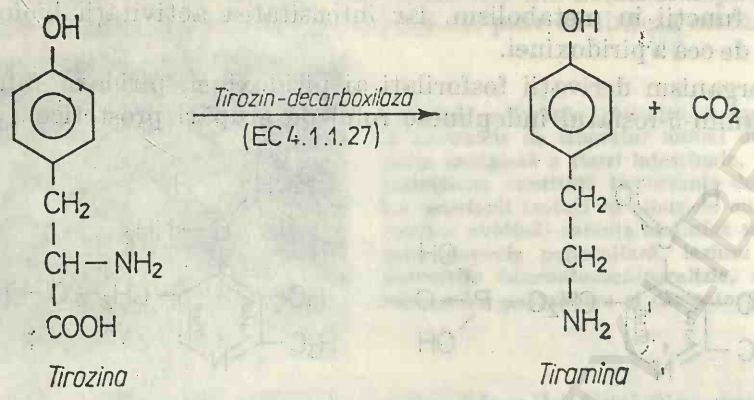


Fig. 8.5. — Modul de legare al piridoxal-5-fosfatului la apoenzima aminotransferazelor

Fosfopiridoxalul îndeplineşte pe lîngă rolul de coenzimă şi o importantă funcţie de stabilizare a structurii terţiare a enzimei. Astfel, de exemplu, fosforilaza musculară *b* în stare nativă este mult mai rezistentă la încălzire în comparaţie cu termorezistenţa apoenzimei, care după o oră de încălzire la 45°C se denaturează ireversibil; în aceleaşi condiţiuni enzima nativă pierde numai 5% din activitate.

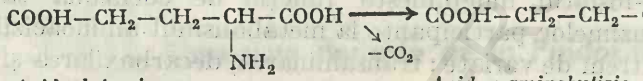
Celelalte forme ale vitaminei B_6, piridoxina şi piridoxamina, nu pot îndeplini funcţiile de coenzimă decît după transformarea lor în piridoxalfosfat. Donatorul grupării fosfat este ATP, transformarea realizîndu-se pe cale enzimatică.

Fosfopiridoxalul este coenzima decarboxilazelor tirozinei, argininei, acidului glutamic. Enzimele din această categorie catalizează reacții de tipul:



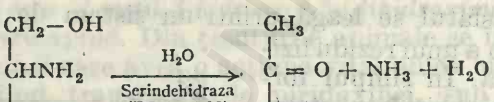
Tirozina *Tiramina*

sau al reacției catalizate de *glutamatdecarboxilază*, enzimă răspîndită la microorganisme, plante și animale, dînd naștere la compuși cu activitate biologică.



Acid glutamic *Acid γ-aminobutiric*

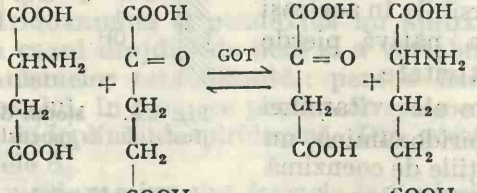
Dezaminazele unor aminoacizi, de exemplu treonina, serina etc. sînt enzime care conțin de asemenea, fosfopiridoxal și care catalizează reacții de tipul:



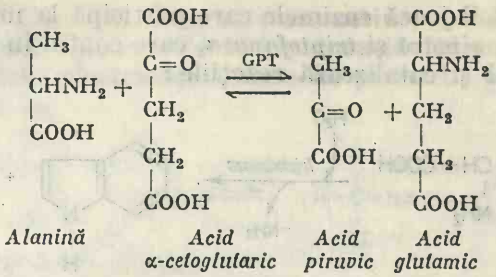
Serina *Acid piruvic*

Cea mai importantă funcție a vitaminei B_6 este însă cea de coenzimă a aminotransferazelor, enzime care transportă gruparea $-NH_2$ de la un substrat la altul. În coenzima aminotransferazelor vitamina B_6 este prezentă sub formă de fosfopiridoxamină.

Descoperite de B r a u n s t e i n și c o l a b. în 1937, aminotransferazele s-au dovedit a fi enzime larg răspîndite în țesuturile animale, vegetale și în microorganisme. În prezent, se cunosc 19 aminotransferaze, cele mai bine studiate fiind *L-aspartat*: *2-oxoglutarat aminotransferaza* (EC 2.6.1.1.) sau GOT și *L-alanin*: *2-oxoglutarat aminotransferaza* (EC 2.6.1.2) sau GPT, care catalizează următoarele reacții:

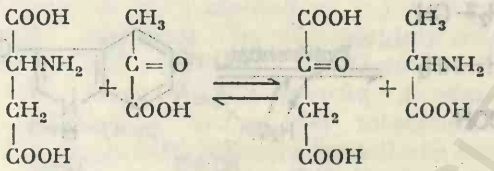


Acid aspartic *Acid α-cetoglutaric* *Acid oxalacetic* *Acid glutamic*



Alanină *Acid α-cetoglutaric* *Acid piruvic* *Acid glutamic*

O altă reacție de transaminare deosebit de importantă este următoarea :

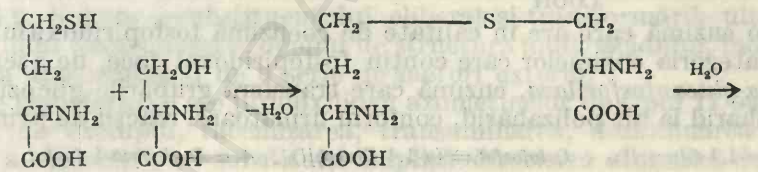


Acid aspartic *Acid piruvic* *Acid oxalacetic* *Alanină*

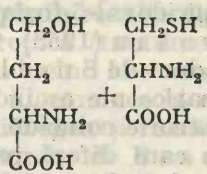
catalizată de *alanin cetoacid aminotransferază.*

Vitamina B_6 intervine, de asemenea, în metabolismul triptofanului, deoarece una din fazele lui de degradare metabolică, transformarea chinureninei în acid 3-hidroxiantranilic, este realizată enzimatic cu participarea chinureninazei, enzimă care conține în calitate de coenzimă fosfopiridoxalul. În avitaminoza B_6, cînd această reacție este blocată, în urina bolnavilor apar cantități mari de acid xanturenic, care cresc dacă aportul de triptofan este stimulat artificial.

Vitamina B_6 intervine, de asemenea și în metabolismul aminoacizilor cu sulf, îndeplinind rolul de coenzimă sub forma de fosfopiridoxal. Astfel, de exemplu, *cistein liaza* este o enzimă care conține fosfopiridoxal și transferă gruparea —SH, efectuînd o transsulfurare :



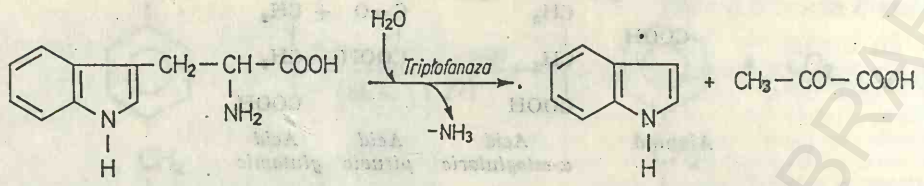
Homocisteină *Serina* *L-Cistationina*



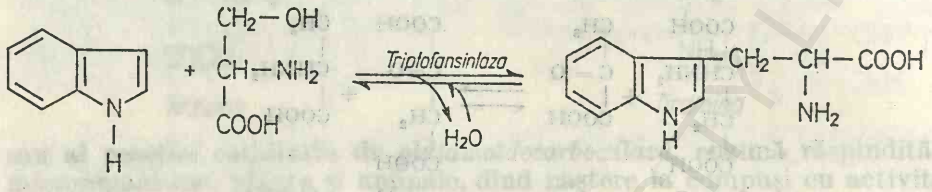
Homoserina *Cisteina*

La bacterii, fosfopiridoxalul constituie coenzima *alaninracemazei* (EC 5.1.1.1.), *metioninracemazei* și *glutamatracemazei*, enzime care catalizează transformarea racemică a aminoacizilor respectivi.

Un rol deosebit îl joacă enzimele care participă la metabolismul triptofanului, *triptofan sintaza* și *triptofanaza*, care conțin în calitate de coenzimă fosfopiridoxal și catalizează reacțiile :

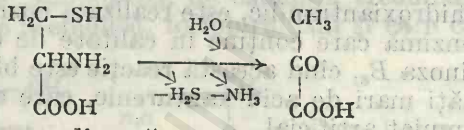


Triptofan *Indol* *Acid piruvic*

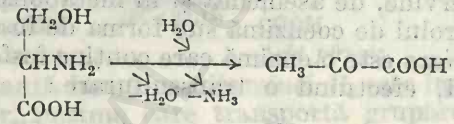


Indol *Serina* *Triptofan*

În unele bacterii care participă la *fermentația lactică* se întîlnesc enzime fosfopiridoxalice, de exemplu, cisteindesulfhidrataza, care catalizează reacția de hidroliză a cisteinei cu formare de hidrogen sulfurat, amoniac și acid piruvic :



Serindehidrataza care realizează reacția :



este tot o enzimă care are în calitate de coenzimă fosfopiridoxalul.

Din categoria enzimelor care conțin fosfopiridoxal face, de asemenea, parte și *α-glucanfosforilaza*, enzimă care transferă grupările glicozil de la un polizaharid la alt polizaharid, conform următoarei reacții de principiu :

$$(\alpha\text{-}1,4\text{-}Glucozil)_n + Ortofosfat \rightleftharpoons (\alpha\text{-}1,4\text{-}Glucozil)_{n-1} + \alpha\text{-}D\text{-}glucoza\text{-}1\text{-}fosfat.$$

Prima interpretare a mecanismului acestor reacții metabolice ale aminoacizilor, dependente de piridoxal-5-fosfat, a fost dezvoltată de Braunstein și Schemyakin (1953). O teorie generală, detaliată, a fost publicată în mod independent de Snell și colab. (1954), în urma studiului interacțiilor neenzimatice ale aminoacizilor cu piridoxal-5′-fosfat, în sisteme model. Această teorie coincide în esență cu cea descrisă de Braunstein și colab., de care diferă prin accentuarea rolului formării unor metal-chelați ai bazelor Schiff în piridoxal-cataliză.

Conform teoriei lui Braunstein și Schemyakin diferitele transformări ale aminoacizilor, catalizate de piridoxal-5-fosfat, sînt posibile datorită unei baze comune : trăsăturile structurale și particularitățile intermediarilor piridoxiliden azometine de tipul II și ale azometinelor tau-

tomere de tipul III (fig. 8.6). În aceste azometine, caracterul α-atomului de carbon și al părților vecine moleculei aminoacidului este modificat substanțial de deplasările electronice induse de prezența unor substituienți

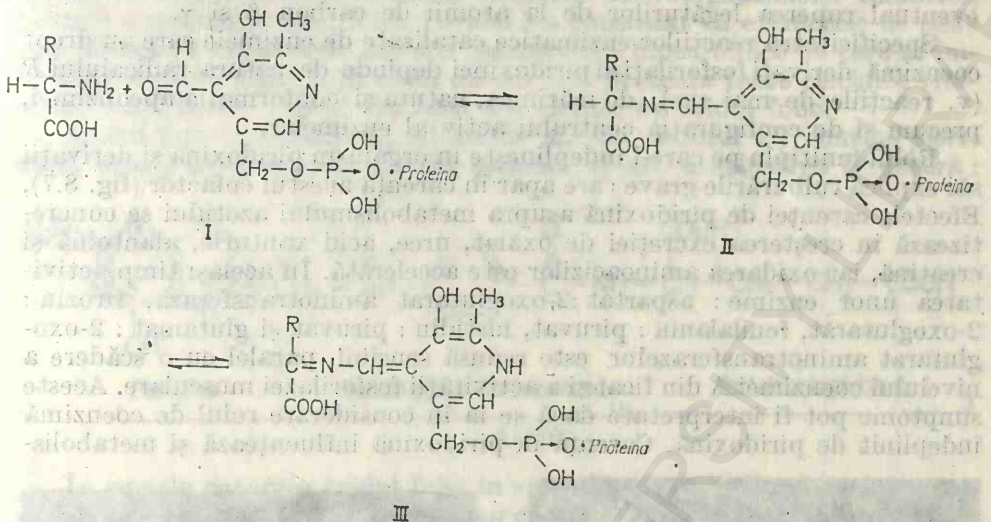


Fig. 8.6. — Structura azometinelor constituite în urma reacției piridoxal-5-fosfatului cu aminoacizii.

puternic electrofili în poziția α (gruparea piridoxiliden atașată la azotul aminic și carboxil) și de influențe inductive externe. Din această cauză, azometinele de acest fel suferă o varietate de reacții de clivaj și de substituție. În azometinele de tipul II și III, densitatea de electroni a α-atomului de carbon este mult scăzută, legăturile dintre acest atom și substituenții lui puternic polarizați sînt slăbite. Legătura afectată în cel mai mare grad de deplasările electronice poate fi ruptă, cu eliberarea unui cation și cu formarea unui rest anionic cu densitate de electroni crescută la atomii 1,3,5,7 și 9. Natura α-substituentului eliberat și transformările ulterioare ale reziduului electronegativ depind de structura aminoacidului, îndeosebi, de natura apoenzimei și de o serie de factori externi.

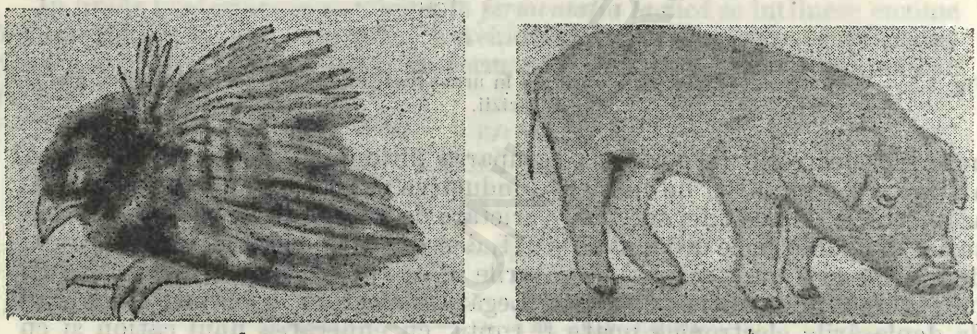
Unele transformări ale piridoxiliden azometinelor de tipul II legate de proteine, de exemplu, racemizarea, transaminarea, dezaminarea neoxidativă a aminoacizilor β-substituiți implică disocierea atomului de hidrogen legat de α-atomul de carbon C_1 și crearea unui centru nucleofilic la acest atom. Această situație poate rezulta fie din substituirea α-hidrogenului, fie din ruperea prototropică (tautomeră) a α-hidrogenului cu formarea unei duble legături, conducînd la o azometină de tipul III. Rearanjarea tautomeră a azometinei II conduce la racemizarea α-aminoacidului.

Ionizarea α-atomului de hidrogen și rearanjarea tautomeră (II ⇌ III) au fost, de asemenea, caracterizate de B r a u n s t e i n și S c h e m y a k i n, în schemele reacțiilor de decarboxilare, a clivajului β-hidroxiaminoacizilor etc., arătînd că aceste trepte nu sînt obligatorii în toate cazurile deoarece scăderea marcantă a densității electronice a α-atomului de carbon, care constituie cauza esențială a tuturor reacțiilor catalizate de piridoxal, este o trăsătură comună azometinelor de tipul II și III.

Prezența substituenților polari în catena radicalului aminoacidului va determina dizlocuiri de electroni ulterioare și schimbări tautomere în azometinele corespunzătoare (I și II), ceea ce conduce la polarizarea și eventual ruperea legăturilor de la atomii de carbon β și γ.

Specificitatea reacțiilor enzimatice catalizate de enzimele care au drept coenzimă derivați fosforilați ai piridoxinei depinde de natura radicalului *R* (v. reacțiile de mai sus), de mărimea, natura și conformația apeonzimei, precum și de configurația centrului activ al enzimelor.

Rolul multiplu pe care-l îndeplinește în organism piridoxina și derivații săi explică tulburările grave care apar în carența acestui cofactor (fig. 8.7). Efectele carenței de piridoxină asupra metabolismului azotului se concretizează în creșterea excreției de oxalat, uree, acid xanturic, alantoină și creatină, iar oxidarea aminoacizilor este accelerată. În același timp activitatea unor enzime : aspartat :2-oxoglutarat aminotransferaza, tirozin : 2-oxoglutarat, fenilalanin : piruvat, histidin : piruvat și glutamat : 2-oxoglutarat aminotransferazelor este redusă sensibil, paralel cu o scădere a nivelului coenzimei A din ficat și a activității fosforilazei musculare. Aceste simptome pot fi interpretate dacă se ia în considerare rolul de coenzimă îndeplinit de piridoxină. Carența în piridoxină influențează și metabolis-



a *b*

Fig.8.7. — În stările de carență piridoxinică la animale s-a constatat scăderea concentrației hemoglobinei, creșterea numărului de leucocite polimorfonucleate însoțită de diminuarea limfocitelor și de hematurie. Convulsiile spontane sînt caracteristice pentru carența în piridoxină la aceste animale :

a — carența piridoxinică la pui de găină ; *b* — la un porc de șase săptămîni.

mul lipidelor, deoarece șobolanii avitaminizați sînt incapabili să sintetizeze grăsimi din glucide, iar conținutul total al lipidelor este scăzut. Starea de hipercolesterolemie care apare în avitaminoza B_6 se datorește mobilizării colesterolului din țesutul hepatic, întrucît biosinteza lui *in vivo* nu se modifică.

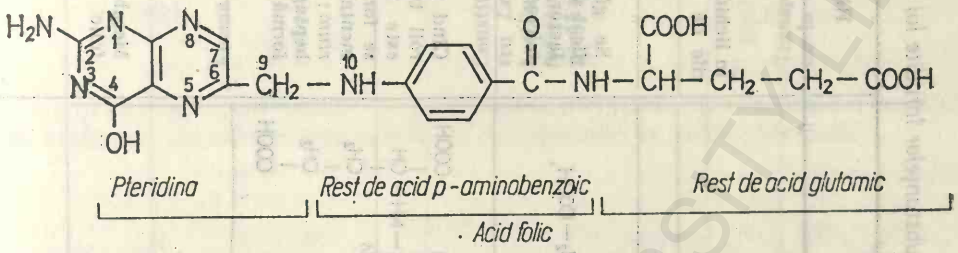
8.3.4 Coenzime derivate de la acidul folic

Primele observații cu privire la prezența unui nou factor alimentar cu acțiune vitaminică datează din anii 1931—1932, cînd s-a constatat că leucopenia și granulocitopenia maimuțelor pot fi vindecate cu ajutorul unui extract obținut din drojdia de bere. Experiențele efectuate cu ajutorul microorganismelor, *Lactobacillus casei* și *Streptococcus faecalis R*, au con-

firmat prezența unei vitamine în extractele de bacterii vitamină necesară pentru creșterea acestor microorganisme.

Mitchell, Snell și Williams, izolează în 1941 din frunzele de spanac o fracție care stimulează creșterea microorganismelor amintite, pe care o denumesc acid folic. Paralel s-a constatat că extractele de ficat sînt eficace în vindecarea anemiei macrocitare hipocromice de care se îmbolnăvesc puii de găină în dieta cărora sînt prezente toate celelalte vitamine. Noul factor extras din ficat era identic cu acidul folic.

Acidul folic (vitamina B_c, vitamina M, sau factorul U) conține *pteridină*, *acid p-aminobenzoic* și *acid glutamic* și are următoarea structură:



În sursele naturale acidul folic în stare liberă se întîlnește relativ rar, deoarece este prezent sub forma unor compuși chimici diferiți care au însă aceeași importanță nutritivă pentru organismele vii. Acidul folic este un monoglutamat; „factorul de fermentare" este un acid folic cu trei resturi de acid glutamic (acid petroil-triglutamic). Tot din sursele naturale a fost extras un derivat al acidului folic, *acidul pteroic*, care, spre deosebire de acidul folic, nu conține acid glutamic.

Dacă la secțiunile de țesut hepatic se adaugă acid folic, acesta este transformat într-un derivat formil, a cărui formare este accentuată de acidul ascorbic. Acest derivat s-a dovedit a fi un factor de creștere pentru organismul *Leuconostoc citrovorum*, din care cauză a fost denumit și factor citrovorum. Izolat ulterior și din ficat, tărîțele de orez și extractele de levuri, precum și preparat pe cale sintetică, acest derivat s-a dovedit a fi acidul 5,6,7,8-tetrahidrofolic sau *acidul folinic*.

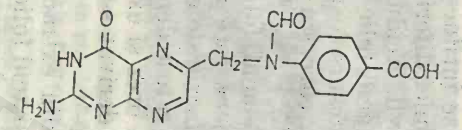
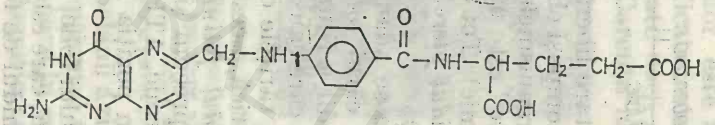
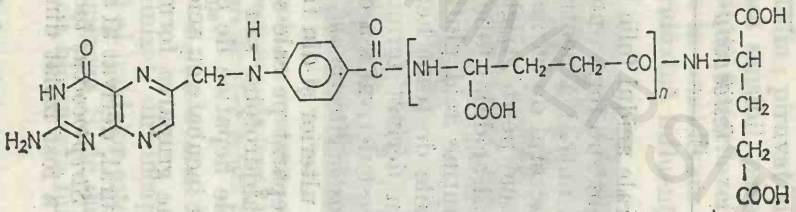
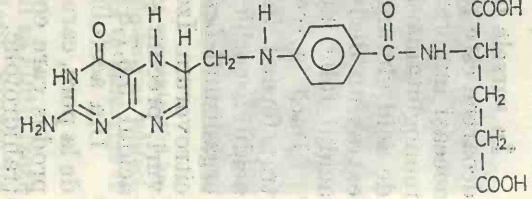
Din acetolizatele hepatice de cal, precum și din extractele hepatice de la porc, care sînt incubate cu acid formic, ATP și acid folic, s-a izolat un produs care conține gruparea formil în poziția N_{10}, denumit acid N_{10}-tetrahidrofolic.

Un compus natural, derivat al acidului folic, este de asemenea și *rizopterina* sau factorul *Streptococcus lactis R*, care este un derivat N_{10}-formil al acidului pteroic și a fost izolat din lichidul de fermentare de la *Rhizopus nigricans*.

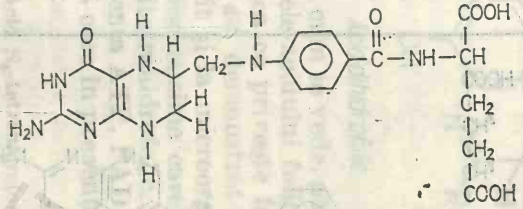
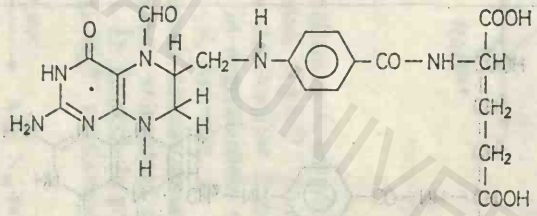
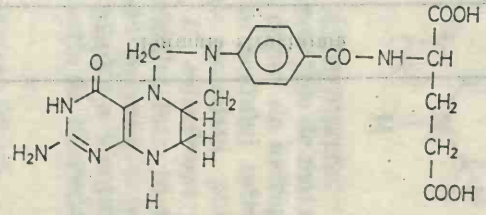
În 1955 s-a demonstrat că celulele de *Bacillus subtilis* și de *S. faecalis* incubate cu acid folic, sînt capabile să sintetizeze acid 5-formil-5,6,7,8-tetrahidropteroil-γ-glutamil-γ-glutamil-glutamic, adică un triglutamat al acidului folinic. Din extractele de *Clostridium cylindrosum* printre cofactorii care catalizează transformarea serinei în glicocol au fost identificați tri-, hexa și heptaglutamații ai acidului folinic, care conțin în molecula lor pe lîngă componentele cunoscute și 2 sau 3 resturi de glicocol și serină. În tabelul 8.2 sînt prezentați acidul folic și compușii înrudiți.

TABELUL 8.2

Structura chimică și răspîndirea acidului folic și a substanțelor înrudite lui

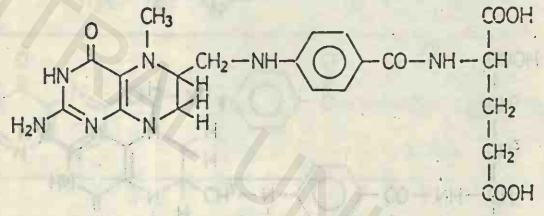
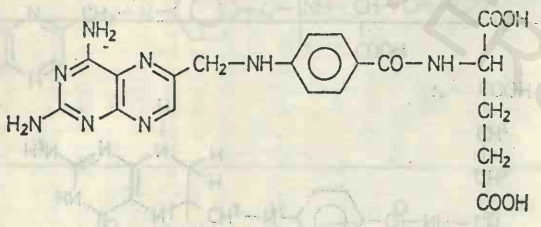
Compusul	Formula structurală	Răspîndire și rol biologic
1. Rizopterina		În lichidul de fermentație din culturile de *Rhizopus nigricans*
2. Acid pteroil-glutamic		Se găsește în legumele verzi, în ficat și în drojdia de bere; constituie factor de creștere pentru unele microorganisme.
3. Acidul pteroil-poliglutamic		Cînd $n = 2$ acidul se numește pteroil triglutamic sau teropterină și este răspîndit la microorganisme; se formează, de asemenea, în fermentațiile induse de *Corynebacterium*; cînd $n = 6$ — acidul pteroil-heptaglutamic și este, probabil, o formă de stocare a acidului.
4. Acid dihidro-pteroilglutamic sau acid dihidrofolic (AF_2)		Metabolit intermediar al acidului folic

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITARĂ LIBRARY

5. Acid tetrahidropteroilglutamic sau acid tetrahidrofolic (AF_4)		Forma activă a acidului folic.
6. Acid 5-fo miltetrahidropteroilglutamic (acid folinic)		Constituie factorul de creştere pentru *Leuconostoc citrovorum*, *Lactobacillus casei*, *L. arabinosus*, *streptococcus faecalis*. În organism transportă radicalii monocarbonici.
7. Acid 5,10-metilentetrahidropteroilglutamic		Transportă radicali monocarbonici de la un substrat la altul.

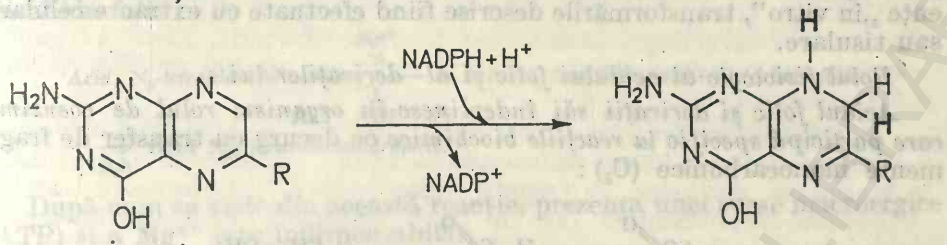
BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

TABELUL 8.2 (continuat)

Compusul	Formula structurală	Răspîndire şi rol biologic
8. Acid 5-metil-tetrahidropteroil-glutamic		Răspîndit în ficat şi în serul sanguin; participă la transportul radicalilor monocarbonici
9. Acid 4-amino-pteroilglutamic		Inhibă diviziunea celulară şi este un antagonist al acidului folic.

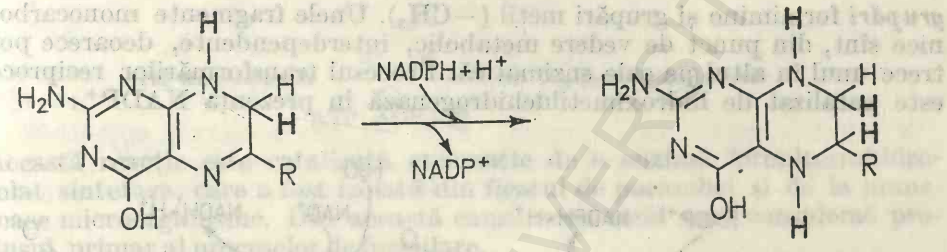
BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Unii derivați ai acidului folic se formează în celulă pe cale enzimatică. Astfel, de exemplu, extractele de *Clostridium striklandii* sînt capabile să catalizeze reacția :



Acid folic *Acid dihidrofolic*

în timp ce din ficatul puilor de găină s-a izolat un sistem enzimatic capabil să realizeze transformarea acidului dihidrofolic în tetrahidrofolic :



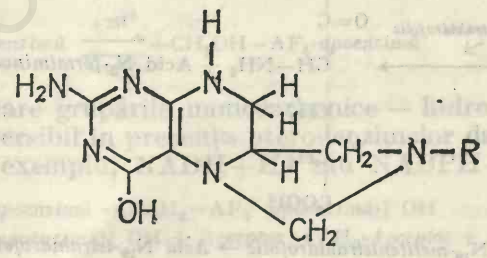
Acid dihidrofolic *Acid tetrahidrofolic*

După cum se vede, ambele enzime care catalizează reacțiile de mai sus, reductazele acidului folic utilizează $NADP^+$ redus ca donor de hidrogen.

În ceea ce privește formarea derivaților formilici ai acidului tetrahidrofolic, s-a demonstrat că atît la organismele animale (șobolani, pui de găină), cît și la microorganisme (*S. faecalis*, *L. casei*, *C. cylindrosporum*) se întîlnesc enzime care catalizează transformarea acidului folic în acid N_5-formiltetrahidrofolic. Reacția este stimulată de acidul ascorbic și necesită prezența ATP, FAD și Mg^{2+}. În ficatul de pui de găină s-a identificat o enzimă care în prezența ATP și Mg^{2+} realizează o reacție de izomerizare de tipul :

$$\text{Acid } N_5\text{-tetrahidrofolic} \xrightarrow{\text{ATP } Mg^{2+}} \text{Acid } N_{10}\text{-tetrahidrofolic} + \text{ADP} + \text{P}$$

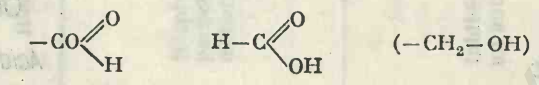
După unii autori, această reacție ar decurge în trei etape distincte, catalizate de trei enzime diferite, compusul intermediar fiind acidul N_5,N_{10}-metilentetrahidrofolic :



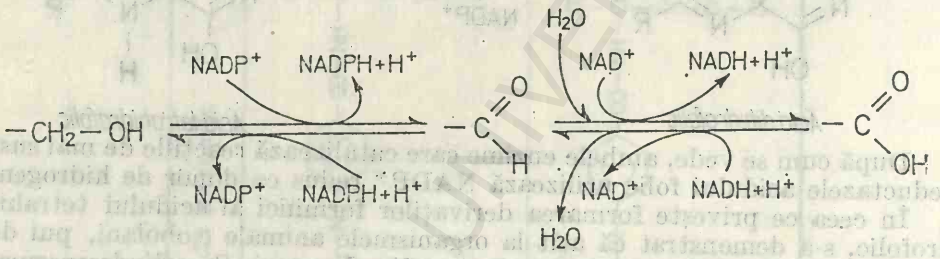
Datorită dificultății de izolare a acestui compus, în literatură există date controversate cu privire la existența lui. De asemenea, enzimele care participă la aceste reacții nu au fost izolate și studiate separat, în experiențe „in vitro", transformările descrise fiind efectuate cu extracte celulare sau tisulare.

Rolul fiziologic al acidului folic și al derivaților lui

Acidul folic și derivații săi îndeplinesc în organism rolul de coenzime care participă specific la reacțiile biochimice ce decurg cu transfer de fragmente monocarbonice (C_1):

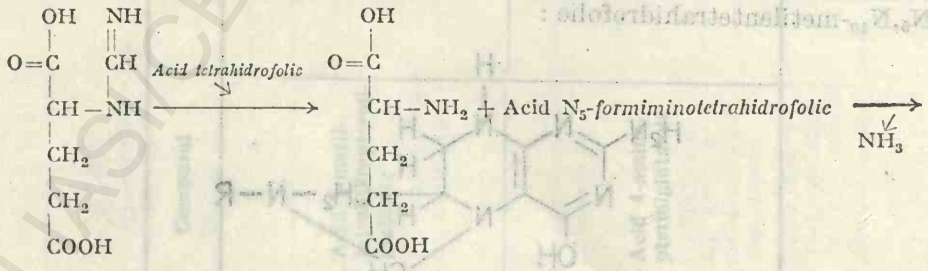


grupări formimino și grupări metil ($-CH_3$). Unele fragmente monocarbonice sînt, din punct de vedere metabolic, interdependente, deoarece pot trece unul în altul pe cale enzimatică. Procesul transformărilor reciproce este catalizat de hidroximetildehidrogenază în prezența $NADP^+$:



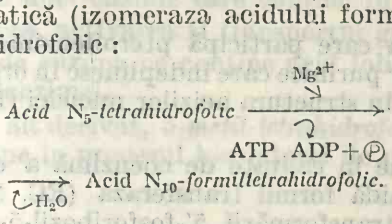
Transportul fragmentului C_1 de la o substanță la alta se realizează de acidul tetrahidrofolic, care formează derivați N_5, N_{10} — sau N_5,N_{10}-tetrahidrofolici.

Acidul N_5-tetrahidrofolic este metabolic inactiv existînd o singură excepție: în metabolismul histidinei, după transformarea acesteia în acid urocanic, apoi în acid imidazolon propionic, se formează ulterior un compus, acidul N-formiminoglutamic, care cedează gruparea formiminică acidului tetrahidrofolic.



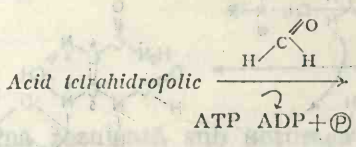
→ Acid N_5, N_{10}-*metilentetrahidrofolic* → *Acid* N_{10}-*tetrahidrofolic*.

Existența acidului N_5-formiltetrahidrofolic în celulă nu constituie un balast, fiind inactiv metabolic, deoarece poate fi ușor transformat, pe cale enzimatică (izomeraza acidului formil tetrahidrofolic) în acid N_{10}-formiltetrahidrofolic :



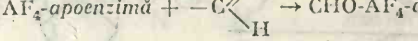
După cum se vede din această reacție, prezența unei surse macroergice (ATP) și a Mg^{2+} este indispensabilă.

Derivatul cel mai activ metabolic al acidului folic este acidul N_{10}-formiltetrahidrofolic, care se poate forma și pe o cale mai simplă, direct prin adiția nemijlocită a fragmentului monocarbonic :



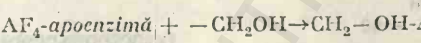
Această reacție este catalizată enzimatic de o enzimă formiltetrahidrofolat sintetaza, care a fost izolată din ficatul de porumbel și de la numeroase microorganisme. Din această cauză acest acid este considerat produsul primar al proceselor de formilare.

Enzimele care conțin acid folic în calitate de coenzime alcătuiesc o grupă denumită *pteroilenzime* sau pteroproteine și catalizează următoarele tipuri de reacții :



$$CHO\text{-}AF_4\text{-}apoenzimă + Acceptor \rightarrow CHO\text{-}Acceptor + AF_4\text{-}apoenzimă$$

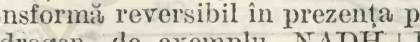
unde AF = acid tetrahidrofolic, iar acceptorul — orice substanță capabilă să primească radicalul formil. Reacția catalizată de pteroilenzimă decurge în două etape distincte :



$$CH_2OH\text{—}AF\text{-}apoenzimă + Acceptor \rightarrow CH_2OH\text{-}Acceptor + AF_4\text{-}apoenzimă.$$

Acest tip de reacții se întîlnesc în procesele de oximetilare și transoximetilare, de exemplu, în cazul transformării glicocolului în serină și decurge, de asemenea în două etape :

sînt reacțiile în care grupările monocarbonice — hidroximetil sau formil se transformă reversibil în prezența pteroilenzimelor dar și a unor donori de hidrogen, de exemplu, NADH+H^+ sau NADPH+H^+:

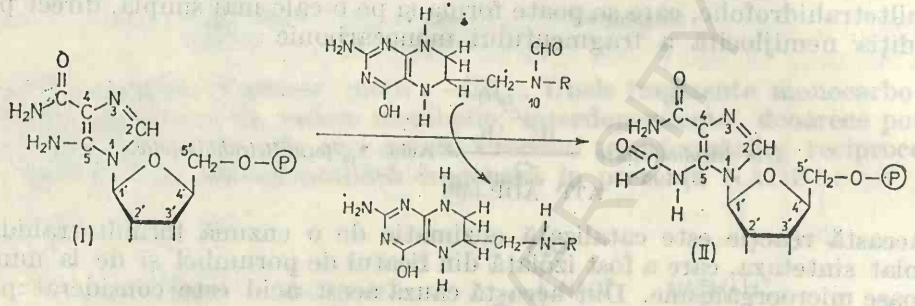


$$[(CH_3\text{—}AF_2^+\text{-}apoenzimă)]\ OH + Acceptor \rightarrow CH_3\text{-}Acceptor + AF_2\text{-}apoenzimă$$

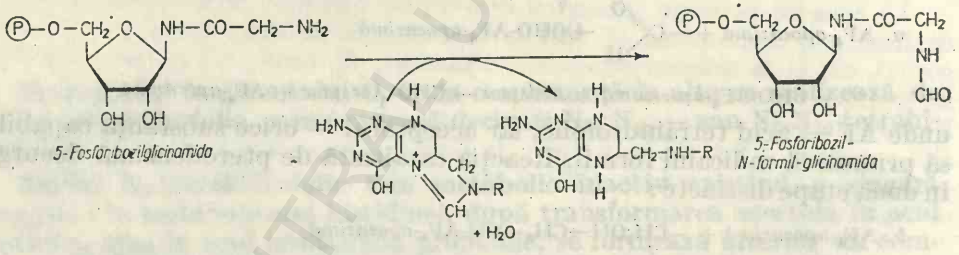
în cursul acestor reacții gruparea hidroximetil este transformată în grupare metil iar coenzima trece din forma de acid tetrahidrofolic în acid dihidrofolic.

Reacțiile cele mai importante la care participă pteroilenzimele sînt legate de sinteza și degradarea bazelor purinice care îndeplinesc în organism roluri deosebit de importante : intră în structura acizilor nucleici (DNA și RNA) și sînt coenzime.

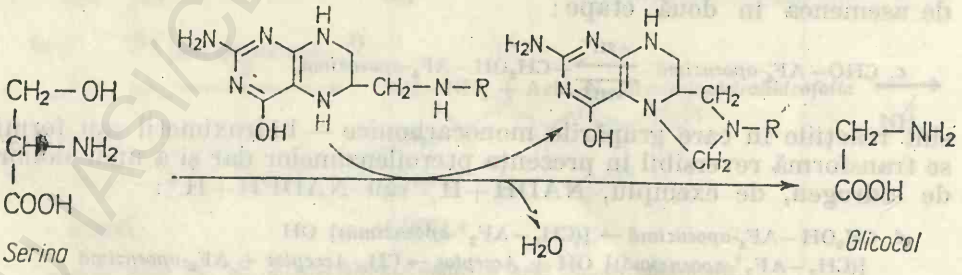
10-Formiltetrahidrofolatul intervine în calitate de coenzimă a enzimei fosforibozil-aminoimidazol-carboxiamidă formil transferaza (EC. 2.1.2.3) în biosinteza purinelor, în treapta transformării 5'-fosforibozil-5-amino--4-imidazol-carboxiamidei (I) în 5'-fosforibozil-5-formamidoimidazol-4--carboxiamidă (II) :



5,10-metiniltetrahidrofolatul catalizează o altă reacție din cadrul biosintezei purinelor sub acțiunea enzimei fosforibozil-glicinamid-formil transferaza (EC 2.1.2.2).

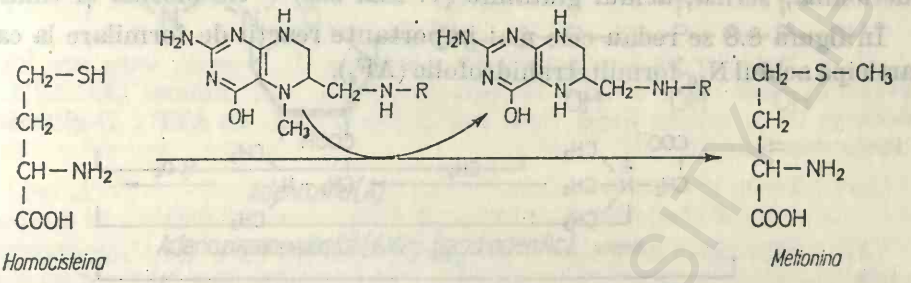


5,10-Metilen-tetrahidrofolatul este coenzima *L*-serin: tetrahidrofolat-5 10-hidroximetil transferazei (EC 2.1.2.1), care catalizează reacția :



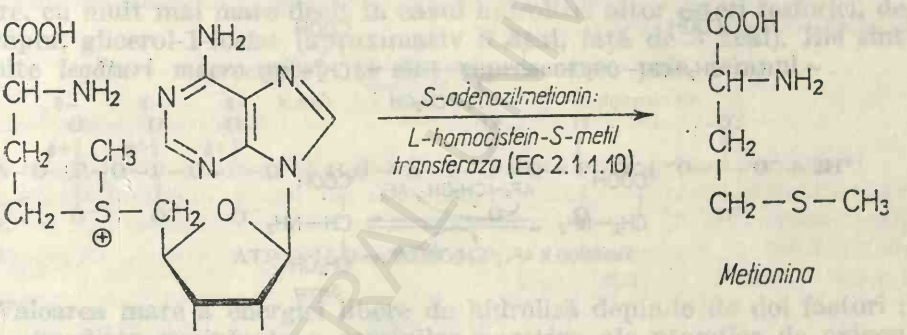
S-a demonstrat că această reacție este catalizată în prezența concomitentă a unei enzime care conține în calitate de coenzimă fosfopiridoxal. Formarea, activarea și transportul grupării hidroximetil sînt procese realizate de enzima ce conține acid folic, dar precedate de acțiunea fosfopiridoxalenzimei.

Un alt derivat, *5-metil-tetrahidrofolatul*, care transportă grupări metil, intervine în procesul biosintezei de metionină din homocisteină:



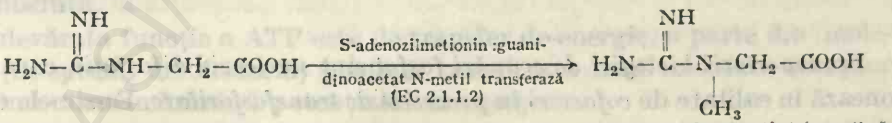
Homocisteina — *Metionina*

Metionina rezultată sub acțiunea metionin adenoziltransferazei (EC 2.4.2.13), este activată formînd compusul S-adenozil-metionina, în urma transferului grupării adenozil din ATP.



S-Adenozilmetionina — *Metionina*

În structura noului compus format metionina devine cel mai important donator de grupări metil. În urma pierderii grupării metil, adenozilmetionina trece în adenozil homocisteină, de exemplu, în cursul unei reacții de tipul următor:



Guanidio acetat — *Metilguanidinoacetiat (creatină)*

Alți acceptori de grupări metil, provenite de la S-adenozilmetionină sînt: *nicotinamida* (cu formare de N'-metilnicotinamidă), *noradrenalina* (cu

formare de adrenalină), *acetil serotonina* (cu formare de melatonină), *fosfatidiletanolamină* (cu formare de fosfatidilcolină), *polinucleotide* (cu formare de polinucleotide metilate) și *homocisteina* (cu formare de metionină).

Formarea acidului N_{10}-formiltetrahidrofolic din fragmentele C_1 este precedată de oxidarea acestora la $-CH_2OH$ și numai sub această formă utilizați ulterior. Sursa fragmentelor C_1 o constituie fie diferiți aminoacizi-metionina, serina, acidul glutamic (v. mai sus) — fie biotina și timina.

În figura 8.8 se redau cele mai importante reacții de formilare la care participă acidul N_{10}-formiltetrahidrofolic (AF_4).

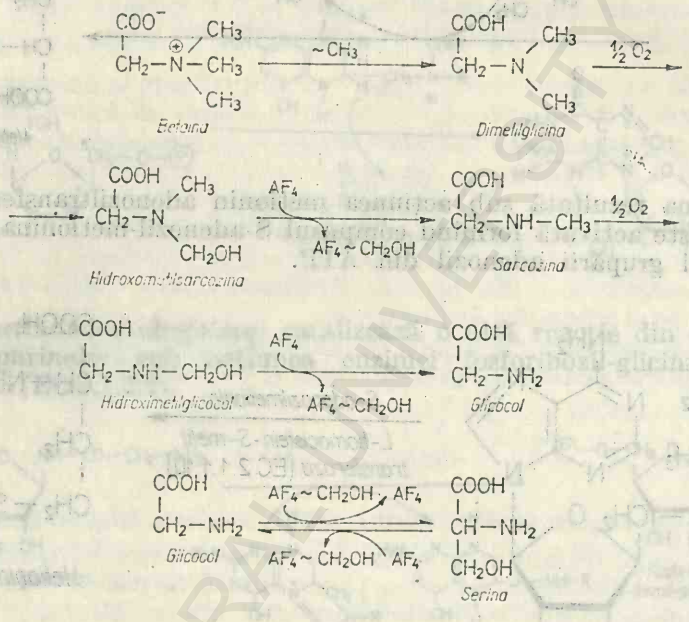


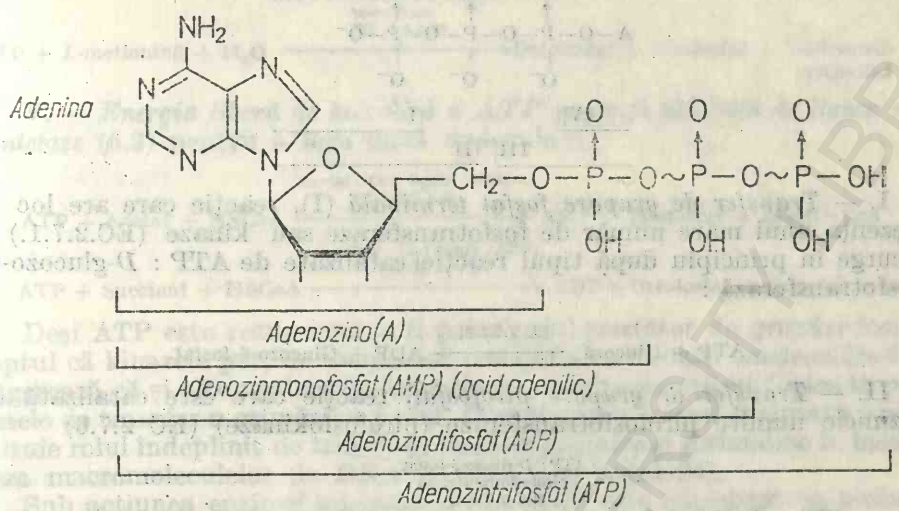
Fig. 8.8. — Schema principalelor reacții la care participă acidul N_{10}formil tetrahidrofolic (AF_4).

8.3.5. Coenzime derivate de la nucleozide

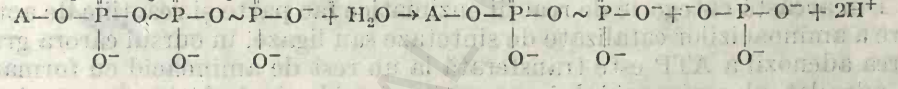
Transportorii biologici de grupări fosfat sînt *nucleozid difosfații*, care acționează în calitate de *cofactori în procesele de transfosforilare*. Enzimele care catalizează reacțiile de transfer spre și de la acești difosfați sînt desemnate cu termenul generic de *kinaze* (EC 2.7.1.) și coenzimele lor conțin atît baze purinice cît și pirimidinice.

8.3.5.1. ADENOZINTRIFOSFATUL (ATP)

ATP este principalul transportor de grupări fosfat.



Legăturile pirofosfat ale ATP sînt hidrolizate cu eliberarea unei energii libere, cu mult mai mare decît în cazul hidrolizei altor esteri fosforici, de exemplu, glicerol-1-fosfat (aproximativ 8 kcal, față de 3 kcal). Ele sînt numite *legături macroergice** și sînt reprezentate prin semnul ~.



$$ATP + H_2O \rightarrow ADP + P_i + 8\,000 \text{ cal.}$$

Valoarea mare a energiei libere de hidroliză depinde de doi factori :

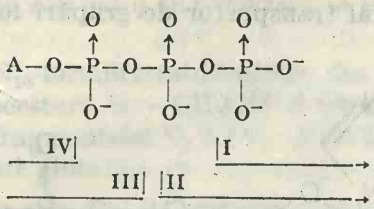
— imediata vecinătate a sarcinilor negative ale atomilor de oxigen plasează molecula sub un stres care este eliberat în urma hidrolizei. Forțele de repulsie electrostatică contribuie la energia eliberată în urma hidrolizei ;

— cînd ionul ortofosfat se separă numărul de forme de rezonanță posibile este crescut, adică produșii de reacție sînt mai stabili decît ATP. Această stabilizare crescută de rezonanță, de asemenea, contribuie la energia eliberată.

Adevărata funcție a ATP este de transfer de energie, o parte din moleculă (în special ortofosfatul) poate fi transferată unei molecule acceptor activînd-o sau mărindu-i potențialul ei energetic.

* Legătura fosfoesterică de la atomul C_5 al ribozei pune în libertate prin hidroliză num i 2—3 kcal, adică de 3—4 ori mai puțin decît celelalte două legături din ATP și de aceea nu este legătură macroergică.

Molecula de ATP poate fi scindată în părți diferite și cel puțin patru fragmente pot fi transferate unei molecule acceptor.



I. — *Transfer de grupare fosfat terminală* (I), reacție care are loc în prezența unui mare număr de fosfotransferaze sau kinaze (EC.2.7.1.) și decurge în principiu după tipul reacției catalizate de ATP : *D*-glucozo-6--fosfotransferază :

$$\text{ATP} + \text{Glucoză} \xrightarrow{\text{(EC 2.7.1.2)}} \text{ADP} + \text{Glucozo-6-fosfat}$$

II. — *Transfer de grupare pirofosfat*, reacție care este catalizată de enzimele numite pirofosfotransferaze (pirofosfokinaze) (EC 2.7.6)

$$\text{ATP} + \textit{D-ribozo-5-fosfat} \xrightarrow[\text{(EC 2.7.6.1)}]{\text{ATP : } \textit{D}\text{-ribozo-5-fosfat pirofosfotransferaza}} \text{AMP} + \textit{5-fosforibozilpirofosfat}$$

III. — *Transfer de acid adenilic*, ce eliberează pirofosfat, catalizat de nucleotidiltransferaze (EC 2.7.7.) :

$$\text{ATP} + \text{Nicotinat ribonucleotid} \xrightarrow[\text{(EC 2.7.7.1)}]{\text{ATP : NMN adenilil transferaza}} \text{Pirofosfat} + \text{Dezamino-NAD}$$

Din această categorie de reacții enzimatice fac parte și reacțiile de activare a aminoacizilor catalizate de sintetaze sau ligaze, în cursul cărora gruparea adenozil a ATP este transferată la un rest de aminoacid cu formare de adenilat al aminoacidului respectiv și acid pirofosforic. În principiu reacția poate fi redată astfel :

$$\text{E} + \text{ATP} + \text{AA} \rightleftharpoons \text{E}\begin{matrix}\text{AMP}\\|\\\text{AA}\end{matrix} + \text{Ⓟ} - \text{O} - \text{Ⓟ}$$

unde E este enzimă ; AA — aminoacid, iar $\text{E}\begin{matrix}\text{AMP}\\|\\\text{AA}\end{matrix}$ — complexul format de aminoacidadenilat și enzimă. Aceste reacții sînt catalizate de aminoacil-tRNA sintetaze localizate în fracția solubilă celulară și îndeosebi în fracția de *p*H 5. Complexul format denumit *aminoacid activat* intră în reacție cu moleculele de *t*RNA după ecuația :

$$\text{E}\begin{matrix}\text{AMP}\\|\\\text{AA}\end{matrix} + \text{tRNA} \rightleftharpoons \text{AA} - \text{tRNA} + \text{AMP} + \text{E}$$

bilanțul celor două reacții fiind următorul :

$$\text{ATP} + \text{AA} + \text{tRNA} \rightleftharpoons \text{AA} - \text{tRNA} + \text{AMP} + \text{Ⓟ} - \text{O} - \text{Ⓟ}.$$

Mecanismul complet al acestor reacții și rolul aminoaciladenialților în celulă sînt descrise în capitolul 21.

IV. — *Transfer de adenozină*, cu eliberare de ortofosfat și pirofosfat

$$\text{ATP} + \textit{L}\text{-metionină} + H_2O \xrightarrow[\text{(EC 2.5.1.6)}]{\text{ATP: }\textit{L}\text{-metionină S-adenozil transferaza}} \text{Ortofosfat} + \text{Pirofosfat} + \text{5-adenozil-metionină}$$

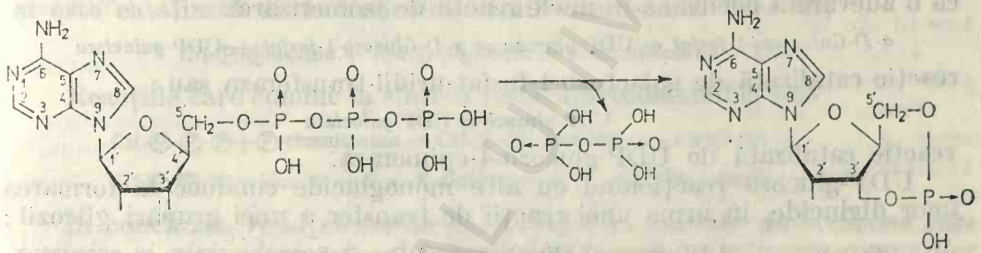
V. — *Energia liberă de hidroliză a ATP poate fi utilizată de ligaze sau sintetaze* (6.2) pentru a lega două molecule:

$$\text{ATP} + \text{Acetat} + \text{HSCoA} \xrightarrow[\text{(EC 6.2.1.1)}]{\text{Acetat: CoA ligaza (AMP)}} \text{AMP} + \text{Pirofosfat} + \text{Acetil}\sim\text{CoA}$$

$$\text{ATP} + \text{Succinat} + \text{HSCoA} \xrightarrow[\text{(EC 6.2.1.5)}]{\text{Succinat: CoA-ligaza (ADP)}} \text{ADP} + \text{Ortofosfat} + \text{Succinil}\sim\text{CoA}$$

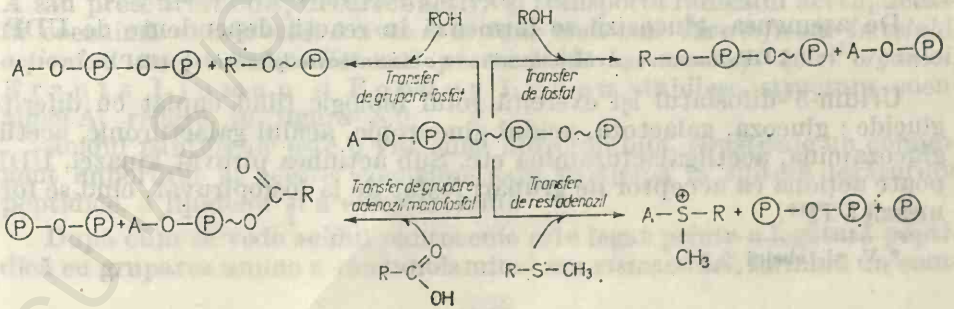
Deși ATP este recunoscut a fi principalul purtător de grupări fosfat, faptul că kinazele pot, de asemenea, reacționa cu ceilalți nucleozidfosfați sugerează că și alte nucleotide îndeplinesc diferite funcții biologice în procesele de transfer a grupărilor fosfat. O confirmare a acestei situații o constituie rolul îndeplinit de trifosfații bazelor purinice și pirimidice în biosinteza macromoleculelor de DNA și RNA (capitolul 20).

Sub acțiunea enzimei adenilatciclazei ATP este hidrolizat cu formare de acid adenozinmonofosforic ciclic și acid pirofosforic:

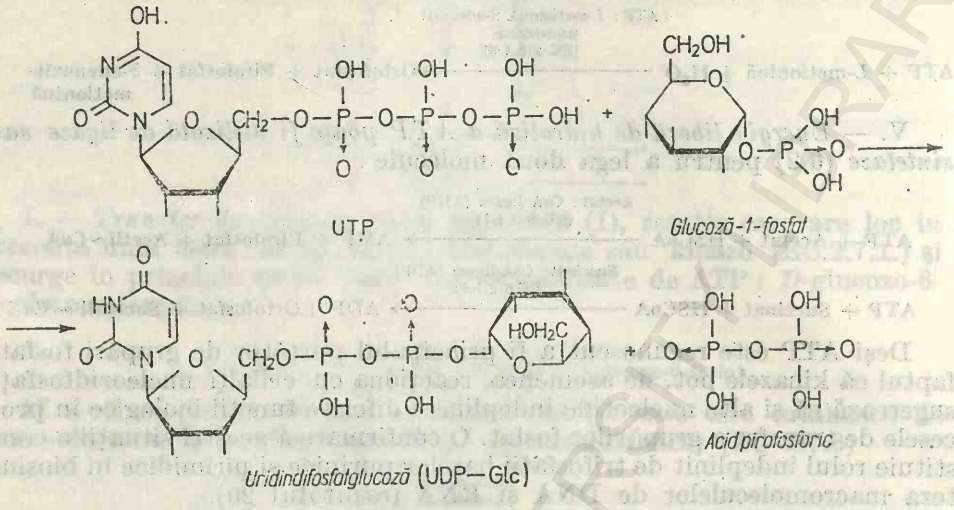


Acidul adenozin-3′,5′-monofosforic ciclic joacă un important rol în medierea răspunsului celular față de acțiunea hormonilor și reglează reacțiile enzimatice și sinteza proteinelor în organism. În organism, în cursul unor reacții similare, se formează și alți derivați ciclici ai nucleotidelor, de exemplu, acidul guanozin-3′,5′-monofosforic ciclic, care par să îndeplinească un rol identic cu cel al AMP-ciclic (Y u d a e v, 1975).

Tipurile de reacții enzimatice catalizate de enzimele care conțin în calitate de coenzime acid adenozintrifosforic sînt ilustrate schematic astfel:



Numeroase enzime care participă la transportul resturilor glicozil conţin în calitate de coenzime uridinfosfaţi. Reacţia catalizată de o enzimă care conţine UTP în calitate de coenzimă este următoarea :



Uridindifosfatglucoza constituie coenzima numeroaselor enzime participante la metabolismul glucidelor. De exemplu, UDP-glucoza acţionează ca o adevărată coenzimă în unele reacţii de izomerizare :

α-D-Galactozo-1-fosfat + UDP-*glucoza* ⇌ *α-D-Glucozo-1-fosfat* + UDP-*galactoza*

reacţie catalizată de galactozo-1-fosfat-uridil-transferaza sau :

UDP-*glucoza* ⇌ UDP-*galactoza*

reacţie catalizată de UDP-glucozo-4-epimeraza.

UDP-glucoza reacţionînd cu alte monoglucide conduce la formarea unor diglucide, în urma unei reacţii de transfer a unei grupări glicozil :

UDP-*glucoza* + *Fructoza* ⇌ UDP + *Zaharoza*

Aceeaşi reacţie poate decurge şi după mecanismul următor :

UDP-*glucoza* + *Fructozo-6-fosfat* = UDP + *Zaharozo-6-fosfat*

cînd în calitate de acceptor al grupărilor glicozil serveşte esterul fosforilat al fructozei.

Formarea β-glucuronidelor are loc printr-o reacţie de transfer în care este implicat UDP-acid glucuronic :

UDP-*acid glucuronic* + *o-aminofenol* → *o-aminofenilglucuronid* + UDP

De asemenea, glucozizii se formează în reacţii dependente de UDP :

UDP-*glucoza* + *Acid antranilic* → *o-Aminobenzoilglucozid* + UDP.

Uridin-5′-difosfatul îşi exercită rolul biologic fiind cuplat cu diferite glucide : glucoza, galactoza, acidul glucuronic, acidul galacturonic, acetilglucozamina, acetilgalactozamina etc. Sub acţiunea piruvat kinazei, UDP poate acţiona ca acceptor de grupări fosfat de la fosfopiruvat, cînd se formează UTP*.

* V. şi tabelul 5.3

Reacții de fosforilare au loc pe cale enzimatică chiar între compușii macroergici celulari :

$$UDP + ATP \rightleftharpoons UTP + ADP$$

$$UMP + ATP \rightleftharpoons UDP + ADP$$

8.3.5.2. Gaunozinfosfații

Îndeplinesc, de asemenea, rolul de *coenzime la levuri* unde participă la transferul resturilor de manoză, de polizaharide de tipul mananilor (pag. 404), constituind o *sursă de manoză activă.*

Rolul coenzimelor de natură nucleozidică în sinteza și metabolismul glucidelor a fost descoperit de biochimistul argentinian, laureat al premiului Nobel, L. L e l o i r.

8.3.5.3. Citidinfosfații

Citidincoenzimele sînt intermediari esențiali într-o serie de reacții care au condus la sinteza enzimatică a fosfatidilcolinei și a fosfatidiletanolaminei. Cuplarea fosforilcolinei cu un α, β-diacilglicerol necesită „activarea" preliminară a fosforilcolinei într-o reacție ce implică CTP :

$$CTP + Ⓟ\text{-}colină \rightleftharpoons Cit\text{-}Ⓟ\text{-}Ⓟ\text{-}colină + Pirofosfat,$$

și este catalizată de fosforilcolin-citidil transferaza. Ulterior,

$$Cit\text{-}Ⓟ\text{-}Ⓟ\text{-}colina + D\text{-}\alpha,\beta\text{-}digliceride \rightleftharpoons Fosfatidilcolină + CMP.$$

Reacțiile care conduc la sinteza fosfatidiletanolaminei sînt :

$$Cit\text{-}Ⓟ\text{-}Ⓟ\text{-}Ⓟ + Ⓟ\text{-}etanolamina \rightleftharpoons Cit\text{-}Ⓟ\text{-}Ⓟ\text{-}etanolamina + Pirofosfat$$

$$Cit\text{-}Ⓟ\text{-}Ⓟ\text{-}etanolamină + D\text{-}\alpha,\beta\text{-}digliceride \rightleftharpoons Fosfatidiletanolamina + CMP.$$

În concluzie, *rolul enzimelor* care *conțin* în calitate de *coenzime baze purinice și pirimidinice di- și trifosforilate* constă în *activarea compușilor biochimici celulari pe seama energiei cuprinse în legăturile macroergice.* Pe de altă parte acest tip de enzime face legătura dintre metabolismul acizilor nucleici și biosinteza enzimelor în celulă.

8.3.5.4. Coenzima A

Descoperită de F. L i p m a n și c o l a b. în 1947 și denumită *coenzima A* sau prescurtat CoA, deoarece activa și transporta radicalul acetil, această coenzimă s-a dovedit a avea o *acțiune mult mai diversificată în celulă, acționînd asupra radicalilor acil proveniți de la numeroși acizi organici.* F r a n t z L i p m a n și F e o d o r L y n e n stabilesc structura coenzimei A, redată în figura 8.9.

Acidul pantotenic este o vitamină hidrosolubilă, constituie un component important al acestei coenzime care participă la sinteza legăturilor peptidice, a lipidelor și a colesterolului.

După cum se vede acidul pantotenic este legat printr-o legătură peptidică cu gruparea amino a tioetanolaminei sau *cisteaminei,* formînd un com-

pus denumit *panteteină*. Prin intermediul unui rest de pirofosfat panteteina este legată de restul unei molecule de acid adenilic.

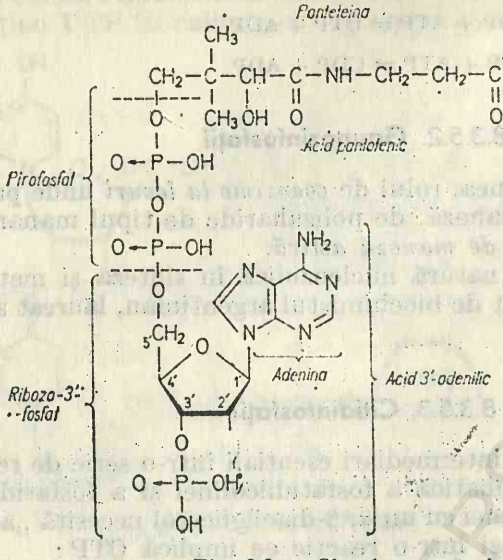


Fig. 8.9. — Structura coenzimei *A*.

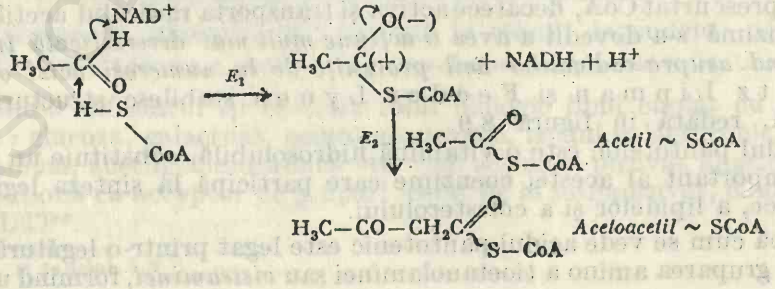
Gruparea funcţională tiol — SH, a coenzimei A participă la numeroase reacţii de activare a metaboliţilor intermediari.

Această coenzimă joacă un *rol deosebit de important în majoritatea reacţiilor care implică transfer de grupări acil.*

Forma sub care coenzima A intră în reacţiile de acilare este acil-coenzima A, $R-CH_2-CO\sim SCoA$. Grupările acil pot fi adăugate grupării tiol a coenzimei A, fie prin transfer direct de grupare acil, de la altă moleculă, fie printr-o reacţie de sinteză. Toate enzimele din subgrupa 6.2.1. catalizează formarea tiolesterilor coenzimei A din acizi liberi, folosind de regulă energia ATP şi numai într-un singur caz energia legăturilor macroergice din molecula de GTP.

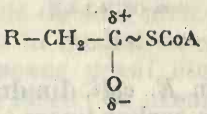
În cele ce urmează se va prezenta formarea acetil-CoA din acetaldehidă. În cursul formării acetil-CoA, catalizatorul enzimatic poate accelera viteza formării tiolesterului printr-o cataliză generală bazică la legătura SH.

Reacţiile ce implică grupări acil se pot produce fie prin deplasarea nucleofilă la carbonul carbonilic, fie prin atacul electrofil la α-carbon, favorizînd condensarea acetil $\sim$ SCoA :



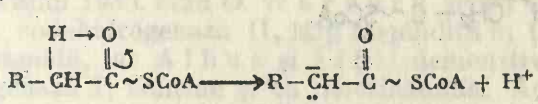
Incapacitatea tiolesterilor de a produce forme de rezonanţă, asemenea esterilor normali ai oxigenului, sporeşte rolul grupării carbonil în care atomul de carbon posedă o sarcină parţial pozitivă :

(*a*)



Aici există tendinţa de disociere a grupării α-metilen vecine într-un carbanion şi un proton.

(*b*)

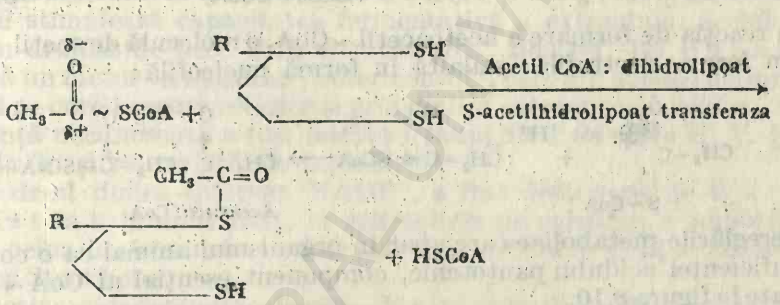


Deci, acil-CoA poate exista în două forme :

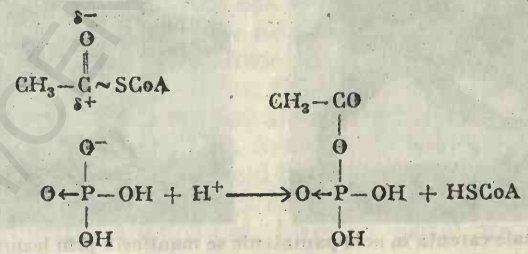
— o formă electrofilică (*a*) în care atomul de carbon carbonilic încărcat pozitiv este deschis atacului compuşilor nucleofilici (încărcaţi negativ);

— o formă nucleofilică (*b*) în care gruparea metilen încărcată negativ este deschisă atacului compuşilor electrofilici (încărcaţi pozitiv).

În forma a, acetil-CoA acţionează într-o reacţie dintr-un lanţ întreg care conduce la eliberarea coenzimei :

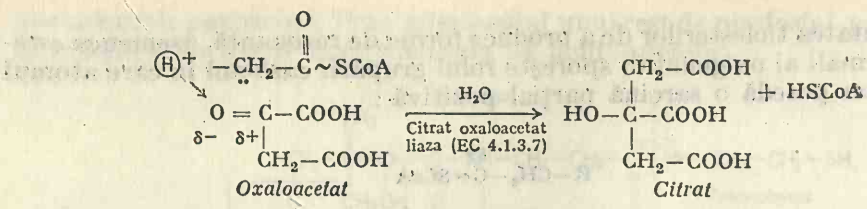


sau în reacţia dintre ortofosfat şi acetil ~ CoA, sub acţiunea enzime acetil ~ CoA : ortofosfat acetil transferaza (Ec 2.3.1.8) :

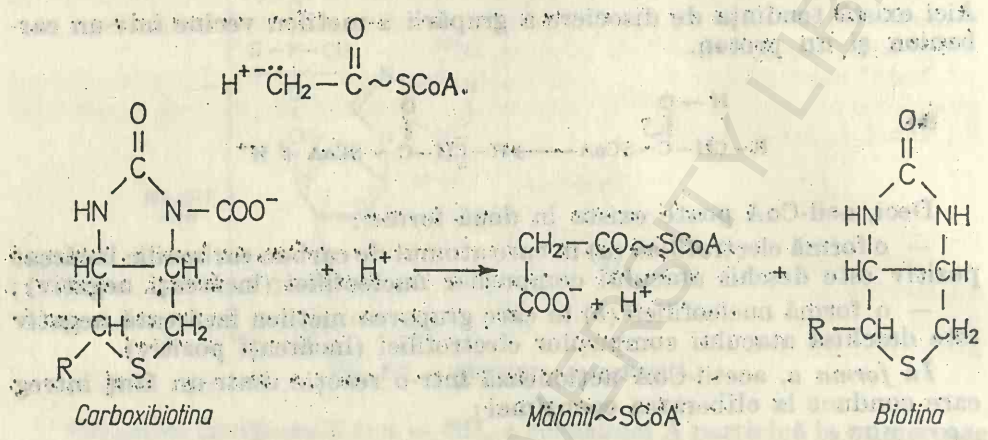


Acetil fosfat

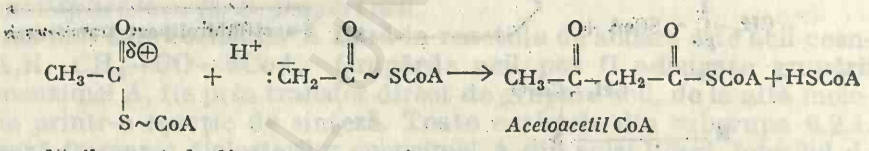
În forma b, acetil ~ CoA reacţionează cu oxalacetatul, în reacţia de formare a acidului citric din cadrul ciclului acizilor tricarboxilici, în ciclul



biosintezei acizilor graşi din *E. coli*, din drojdie, sau în reacţia catalizată de acetil ~ CoA : bioxid de carbon ligaza (ADP) (EC 6.4.1.2) :



În reacţia de formare a acetoacetil ~ CoA, o moleculă de acetil ~ CoA se află în formă electrofilă, cealaltă în formă nucleofilă :



Dereglările metabolice care apar în organismul animal ca o consecinţă a insuficienţei acidului pantotenic, component esenţial al CoA ~ SH sînt ilustrate în figura 8.10.

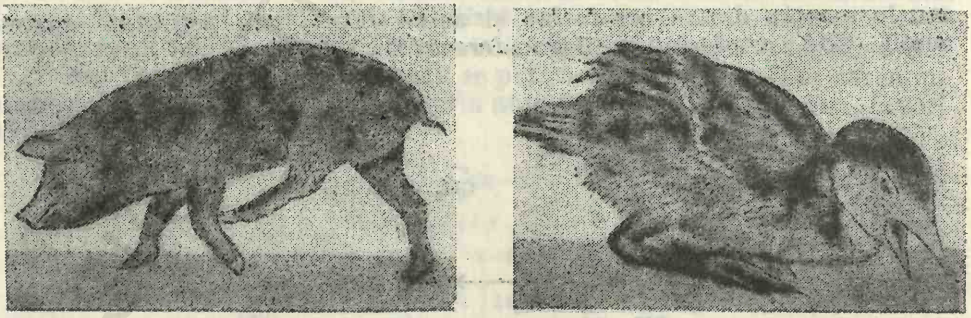


Fig. 8.10. — La animale carenţa în acid pantotenic se manifestă prin leziuni ale pielii (dermatite la puii de găină), decolorarea părului sau a blănii (acromotrichia la şobolani), alopecia la şoarece.

a. —lipsa de acid pantotenic la porc este însoţită de diaree, perturbarea coordonării mişcărilor, degenerarea tecii mielinice a nervilor ; *b.* aceleaşi simptome se manifestă şi la curcani, care-şi pierd capacitatea de a-şi menţine poziţia verticală (după Trufanov, 1959).

8.3.5.5 Coenzimele nicotinamidnucleotidice.

Majoritatea organismelor animale, precum și numeroase microorganisme, necesită un aport zilnic de acid nicotinic (niacină) sau de nicotinamidă în dieta alimentară sau în mediul de cultură. Unele microorganisme, *Neurospora crassa*, *Xanthomonas pruni* etc., sînt capabile să sintetizeze această vitamină, în timp ce altele, de exemplu, *S. aurens*, *C. diphtheriae*, *Proteus vulgaris*, *Acetobacter suboxidans*, *B. mesentericus*, *C. tetani*, *Leuconostoc mesenteroides* etc. au nevoie de acid nicotinic ca *factor de creștere*.

Importanța amidei acidului nicotinic în alimentația omului a fost apreciată după anul 1935, cînd O. Warburg și Cristian au arătat că o coenzimă, codehidrogenaza II, larg răspîndită în țesuturile animale, conține nicotinamidă, iar Albus și alții demonstrează că coenzima sau codehidrogenaza I, conține și ea nicotinamidă. Aceste două coenzime au fost denumite în 1960 NAD^+ și $NADP^+$ (după nomenclatura Enzyme Commission of IUB).

Cele două coenzime — NAD^+ și $NADP^+$ — acționează ca agenți de transfer ai hidrogenului și ai electronilor, datorită unor procese de oxidare și reducere reversibile îndeplinind un rol foarte important în metabolism. Datorită rolului lor în metabolism devine clară importanța niacinei pentru nutriția umană și necesitățile în această vitamină ale altor organisme, printre care bacteriile și levurile, au fost elucidate relativ recent. Astfel, la începutul secolului al XX-lea Harden și Joung (1904) au observat că fosfatul stimulează capacitatea fermentativă a extractului acelular obținut din drojdia de bere. Prin ultrafiltrarea „zimazei" lui Büchner ei izolează un factor termostabil „cofermentul", care are aceeași acțiune catalitică și pe care-l separă ulterior și prin dializa extractului acelular. Această substanță necunoscută a fost izolată în anul 1931 de către H. V. Euler și colab. și reprezintă de fapt NAD^+.

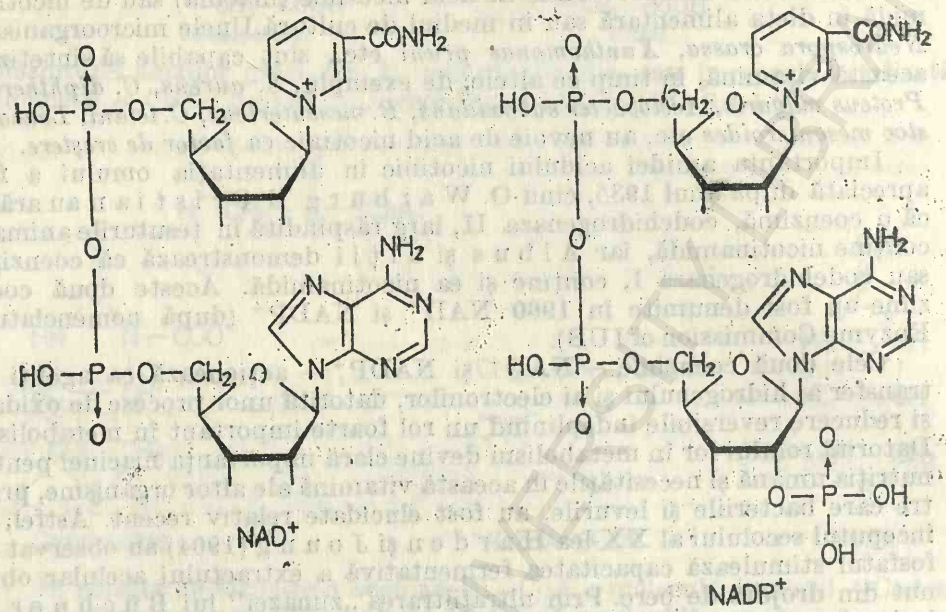
Cel de-al doilea cofactor, $NADP^+$, a fost descoperit de Warburg și Cristian în anul 1931, în eritrocitele de cabaline. Compoziția chimică a celor două coenzime a fost stabilită în 1936 în două laboratoare din Berlin și Stockholm.

Nicotinamidadenindinucleotida, NAD^+, este formată din două nucleotide: una din acestea este un compus format din amida acidului nicotinic, *D*-riboză și un radical al acidului fosforic, iar cea de a doua reprezintă acidul adenozinmonofosforic. Legăturile dintre molecula *D*-ribozei și azotul adeninei, pe de o parte, și dintre cea de a doua moleculă de *D*-riboză și azotul amidei acidului nicotinic, pe de altă parte, sînt legături de tip β-N-glicozidic, în timp ce acidul fosforic în ambele nucleotide formează cu *D*-riboza un compus ribozo-5′-fosfat. Cele două nucleotide sînt legate între ele prin intermediul a două resturi ale acidului fosforic.

Nicotinamidadenindinucleotida fosforilată, $NADP^+$, în comparație cu NAD^+, conține în plus un rest de acid fosforic. În anul 1950 s-a stabilit că acest rest este legat de hidroxilul celui de-al doilea atom de carbon al ribozei din compoziția adenozinei, formînd astfel un acid adenozin-2′-fosforic.

Proprietatea fizică cea mai caracteristică pentru nicotinamida acestor coenzime constă în apariția unor regiuni de absorbție în *UV* pentru formele reduse care au un maxim la 340 nm, ca urmare a dispariției structurii

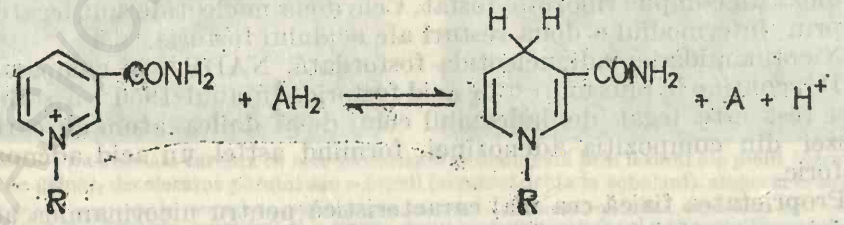
aromatice a niacinei. Forma oxidată a coenzimei, care este de fapt forma cationică a moleculei, posedă în ciclul piridinic al amidei acidului nicotinic, un atom de azot cuaternar cu proprietăţi bazice pronunţate ; are 4 legături



covalente şi o legătură electrovalentă. Sarcina electropozitivă a atomului de azot în soluţie este echilibrată, probabil, de un anion oarecare, de exemplu, de $H_2PO_3^-$. La *p*H 7,5 două grupări —OH ale radicalilor acidului fosforic sînt ionizate şi ionii lor de hidrogen se găsesc în soluţie în stare liberă. În $NADP^+$ în soluţie se găsesc patru grupări ionizate ale celor trei radicali ai acidului fosforic.

Coenzimele pot fi uşor reduse şi din nou oxidate, fie pe cale enzimatică cu participarea unor dehidrogenaze specifice, fie pe cale chimică sub influenţa unor agenţi oxidanţi sau reducători. Forma redusă a coenzimelor este relativ stabilă în soluţii alcaline, însă foarte labilă în soluţii acide, în timp ce forma oxidată este labilă în soluţii alcaline şi stabilă în soluţii acide.

Mecanismul de acţiune al acestor coenzime se rezumă la reducerea reversibilă a ciclului piridinic :



unde R = restul moleculei de NAD.

Unul din cei doi atomi de hidrogen, rezultați în urma oxidării substratului se fixează la nivelul nucleului piridinic, iar cel de-al doilea atom de hidrogen, cedînd electronul său atomului de azot din ciclu, trece în soluție sub formă de proton. În forma redusă de $NADH+H^+$ azotul terțiar al ciclului piridinic este o bază foarte slabă. Reacția catalitică sub această formă indică transportul stoichiometric al hidrogenului de la substrat la coenzimă.

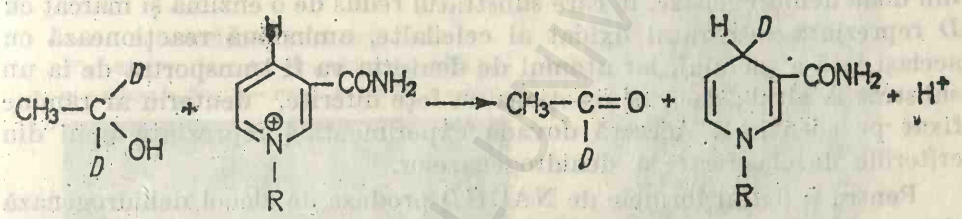
NAD^+, cu participarea dehidrogenazelor, care posedă o specificitate de grup, este capabil să oxideze un număr relativ mare de substrate în timp ce $NADP^+$ oxidează un număr mult mai mic. De regulă, enzimele care reduc NAD^+ nu reacționează cu $NADP^+$ și invers. De la această regulă sînt însă și unele excepții.

Funcția celor două coenzime în celulă este de asemenea, diferită: NADH cedează hidrogenul, în majoritatea cazurilor, enzimelor din lanțul respirator, în timp ce NADPH cedează hidrogenul diferitelor sisteme enzimatice care participă la diverse biosinteze.

Enzimele care conțin în structura lor nicotinamiddinucleotide aparțin clasei oxidoreductazelor și se întîlnesc în toate tipurile de celule.

În cele ce urmează vom lua în studiu una dintre oxidoreductazele NAD dependente cel mai intens studiate din punct de vedere al mecanismului ei de acțiune, alcool dehidrogenaza.

Folosind CH_3-CD_2-OH ca substrat, reacția catalizată de această enzimă este:



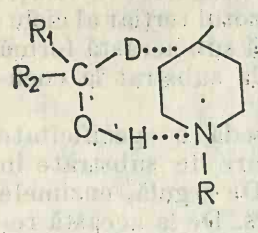
Coenzima redusă a fost izolată și s-a determinat că conține un atom de deuteriu per moleculă; de asemenea s-a pus în evidență formarea aldehidei acetice. Coenzima redusă, $NADD+H^+$ poate fi reoxidată cu aldehidă acetică în prezența alcool dehidrogenazei (reacția inversă) sau cu piruvat, în prezența lactat dehidrogenazei. În amîndouă cazurile, deuteriul este îndepărtat din coenzimă; lactatul format conține un atom de deuteriu per moleculă, ceea ce a permis formularea următoarelor concluzii:

— *reacția are loc printr-un transfer direct de atomi de hidrogen (sau deuteriu) de la o moleculă la alta*; dacă ar fi avut loc un transfer de electroni, avînd în vedere faptul că reacția a avut loc în H_2O și nu în D_2O, ar fi urmat formarea ionilor de hidrogen și nu de deuteriu, care sînt transferați coenzimei;

— *în timpul reacției orientarea relativă a substratului și coenzimei este întotdeauna aceiași*; atomul de hidrogen (sau deuteriu) este totdeauna transferat atomului C_4 din nucleul coenzimei, iar hidrogenul hidroxilic este transferat azotului;

— *reacția este stereochimic specifică*, avînd loc numai pe o față a planului inelului. Legăturile care unesc atomii de *D*, H și C din molecula alcoo-

lului formează un plan perpendicular pe planul inelului; dacă inelul se găsește așezat în planul hîrtiei, atomul de H se află sub aceasta, iar atomul de *D*, deasupra ei. Faptul că inelul nicotinamidic prezintă nu numai o față a substratului și că inelul este împiedecat de-a se învîrti, prin legarea grupării lui amidice cu proteina enzimatică, îndreaptă atomii de H și *D* totdeauna în aceiași direcție. Dacă gruparea amidică ar fi absentă, astfel încît cele două fețe ale inelului ar fi echivalente, sau dacă substratul ar reacționa cu fiecare față a inelului, atomii de *D* prezenți în molecula de coenzimă redusă ar trebui să fie distribuiți egal între cele două poziții și numai jumătate din cantitatea de deuteriu ar putea fi îndepărtată prin reoxidarea enzimatică. Este interesant faptul că atunci cînd coenzima este redusă neenzimatic, de exemplu, cu ditionit, în mediu de D_2O, coenzima redusă conține, de asemenea, un atom de *D* par moleculă, dar deuteriu este distribuit în mod egal între cele două poziții. Prin reoxidare cu piruvat, în prezența lactat dehidrogenazei, numai jumătate din cantitatea de deuteriu este îndepărtată, demonstrînd că enzima reacționează numai cu o poziție;



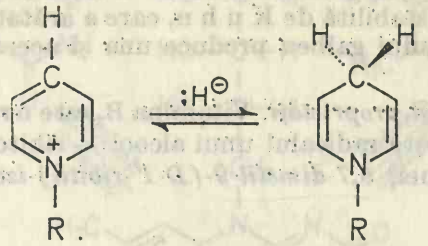
— *substratele alcool și lactat dehidrogenazelor reacționează cu aceiași față a inelului*, așa încît oricare din atomii de *D* adăugați de o enzimă sînt îndepărtați de cealaltă. Cu toate acestea, nu toate dehidrogenazele acționează cu aceiași față a inelului piridinic. Într-un sistem enzimatic format din două dehidrogenaze, în care substratul redus de o enzimă și marcat cu *D* reprezintă substratul oxidat al celeilalte, amîndouă reacționează cu aceiași față a inelului, iar atomul de deuteriu va fi transportat de la un substrat la altul; dacă ar reacționa cu fețe diferite, deuteriu ar rămîne fixat pe coenzimă. Această dovadă experimentală reprezintă unul din criteriile de clasificare a dehidrogenazelor.

Pentru a defini formele de NADH*D* produse de alcool dehidrogenază și respectiv de α-hidroxisteroid dehidrogenază, au fost propuși termenii de „forma A" și „forma B". Cele două forme NADPH*D* sînt legate de acelea NADH*D* prin acțiunea fosfatazei care îndepărtează gruparea 2′-fosfat fără modificarea configurației inelului.

Poziția relativă a substratului și a coenzimei față de centrul activ al enzimei determină, probabil, care față a inelului piridinic este reacționabilă.

În reacțiile catalizate de oxidoreductaze care au în calitate de coenzimă NAD sau NADP, hidrogenul este fie adăugat, fie luat de la atomul C_4 al nucleului piridinic. Reducerea piridinnucleotidelor are ca rezultat formarea unui atom C_4 tetraedric. A fost arătat că transferul de hidrogen la poziția C_4 este stereospecific. În acest proces, de fapt, atomul de hidrogen este transferat de la substrat la situsul electrofil C_4 al nucleului piridinic sub forma unui *ion hidrură* (un proton cu o pereche de electroni). În același timp, substratul pierde un al doilea hidrogen ca proton. Nu se cunosc detalii asupra mecanismului de transfer al ionului hidrură deoarece în absența enzimei, nici coenzima, nici compuși model, structural înrudiți, nu vor

reacționa ca substrate ale reacțiilor enzimatice, chiar cînd formarea produsului este termodinamic posibilă :



În lumina rolului îndeplinit în organismele animale de compușii pe bază de niacină pot fi explicate gravele perturbări care survin în carența de niacină. Lipsa niacinei în alimentația omului este însoțită de apariția unor boli grave : pelagra (pelle agra—piele aspră), dermatite caracteristice, de lungă durată, dereglări ale activității tractului gastro-intestinal (diaree), inflamații ale mucoasei cavității bucale și ale limbii, inflamarea dermei (dermatită) iar în cazurile mai grave, perturbări ale activității sistemului nervos central (demență). Pelagra este denumită uneori și boala celor trei *D*,

Fig. 8.11 — Carența în niacină la animale :
a. — pelagra la cîine; *b* — starea de perozis la curcan.

a *b*

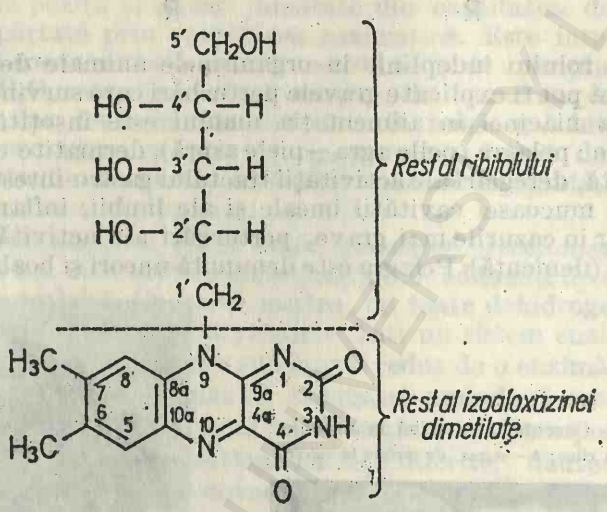
însă trăsătura specifică pelagrei este dermatita, care apare simetric și bilateral pe mîini, pe față și în general pe locurile neacoperite de îmbrăcăminte. În figura 8.11 este redată carența de niacină la animalele domestice.

8.3.5.6. Coenzimele flavinice

În anul 1879 a fost observată existența în lapte a unui pigment galben-verzui puternic fluorescent ; această substanță, riboflavina a fost izolată mult mai tîrziu, în 1932 de K e i h n și c o l a b. din albușul de ou *(ovoflavină)*. În același an se semnalează prezența unui compus similar, în lapte

(lactoflavina), ficat, rinichi, urină *(uroflavina)*, mușchi, levuri, malț, lucernă și în unele plante *(verdoflavina)*, care mai tîrziu s-a dovedit a fi asemănător cu „fermentul galben" izolat de Warburg și Christian. Identitatea lor a fost stabilită de Kuhn, care a arătat că iradierea ovoalbuminei și a fermentului galben produce una și aceeași substanță *lumiflavina*.

Structură. Sinteză și proprietăți. Vitamina B_2 este o riboflavină, deoarece în structura ei se găsește radicalul unui alcool — ribitolul — și un derivat metilat al izoaloxazinei, *6,7-dimetil-9-(D-1'-ribitil)-izoaloxazina*:



Riboflavina cristalizată este stabilă la întuneric la temperatura camerei, nu se degradează prin încălzire, însă este ușor descompusă sub influența luminii. În soluții este instabilă, în special în soluții alcaline expuse la lumină, cînd se transformă în *lumiflavină*, iar prin iradierea soluțiilor neutre sau acide se produce un alt compus *lumicromul*.

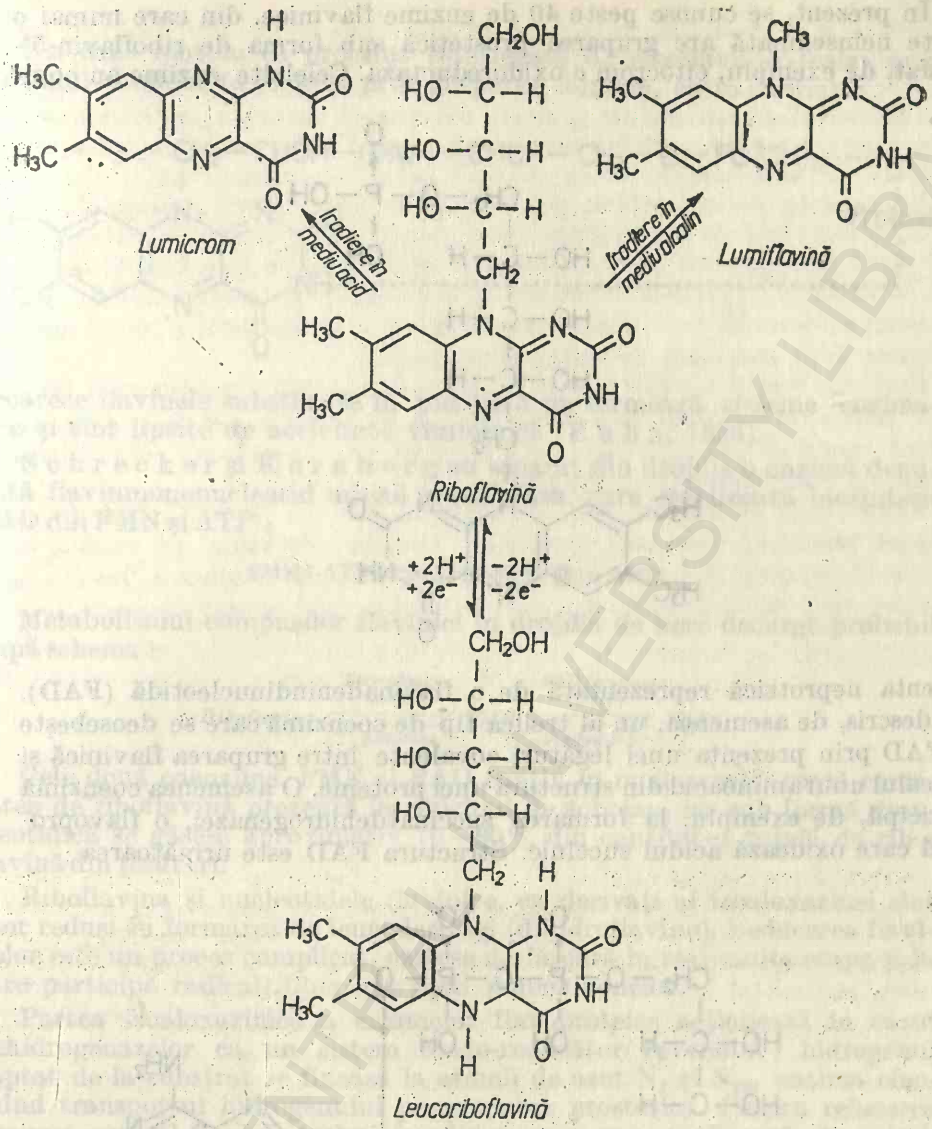
Riboflavina este redusă reversibil de către lumina vizibilă în prezența unor chelați ai metalelor. Acest proces de fotoreducere este inhibat de unele metale, dinitrofenol, azida de Na, p-nitrobenzaldehidă. Inhibiția este reversibilă numai în prezența unui exces de riboflavină.

Riboflavina este sensibilă la acțiunea agenților reducători, fiind redusă cu formarea unui compus incolor, *leucoriboflavina*, care este fluorescent și în prezența aerului trece din nou în riboflavină. Oxido-reducerea reversibilă joacă un rol important în organism, condiționînd activitatea biologică.

Structura chimică a riboflavinei a fost confirmată prin sinteze în laborator.

În celulele vii riboflavina intră în constituția a doi cofactori enzimatici flavinmononucleotidul (FMN) și flavinadenindinucleotidul (FAD).

Conținutul riboflavinei în sîngele uman este de 0,5 μg/ml. În serul sanguin riboflavina în stare liberă formează 0,0084 μg/ml, iar sub formă de

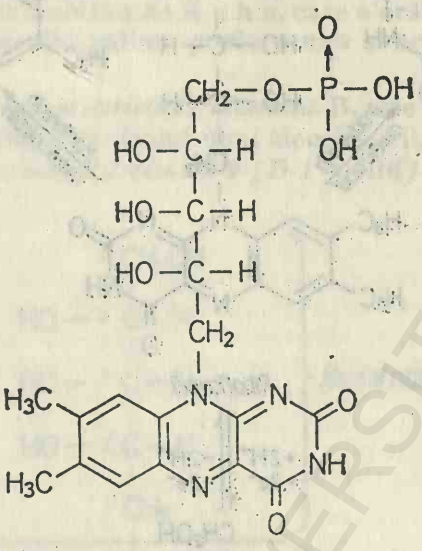


flavinadenindinucleotid (FAD) — 0,02 μg/ml. Injectarea riboflavinei în circuitul sanguin determină o stocare a ei la nivelul țesutului hepatic. Depozitarea riboflavinei în ficat s-a constatat și în cazurile cînd dieta este bogată în proteine (în special cazeină). Perioada de înjumătățire a ^{14}C-riboflavinei hepatice este de 6 $^1/_2$ zile.

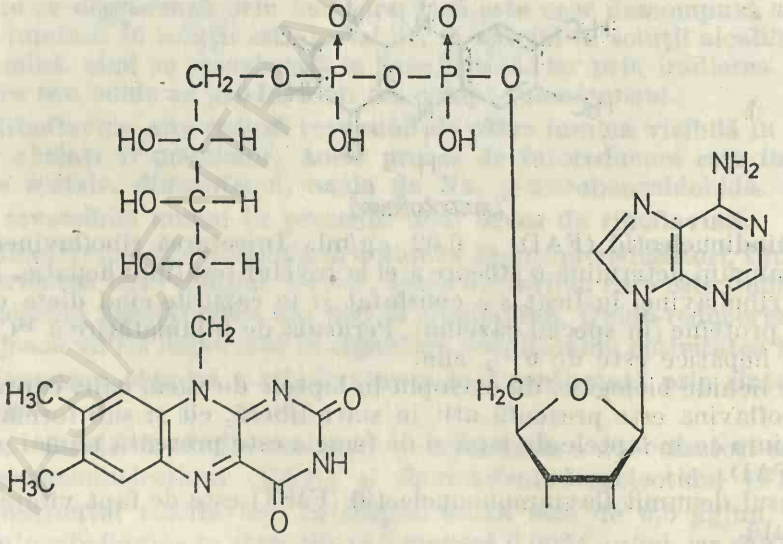
În alte lichide biologice, de exemplu în laptele de vacă, oaie, capră și iepure riboflavina este prezentă atît în stare liberă, cît și sub formă de FAD, în timp ce în laptele de iapă și de femeie este prezentă numai sub forma de FAD.

Compusul denumit flavinmononucleotid (FMN) este de fapt vitamina B_2 fosforilată.

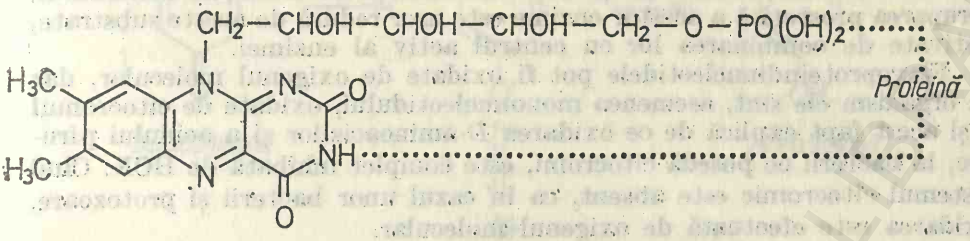
În prezent, se cunosc peste 40 de enzime flavinice, din care numai o parte neînsemnată are gruparea prostetică sub forma de riboflavin-5′--fosfat, de exemplu, citocrom *c* oxidoreductaza. Celelalte enzime au com-



ponenta neproteică reprezentată de o flavinadenindinucleotidă (FAD). S-a descris, de asemenea, un al treilea tip de coenzimă care se deosebește de FAD prin prezența unei legături covalente între gruparea flavinică și radicalul unui aminoacid din structura unei proteine. O asemenea coenzimă participă, de exemplu, la formarea succinatdehidrogenazei, o flavoproteidă care oxidează acidul succinic. Structura FAD este următoarea :



S-a emis ipoteza că proteina este legată de riboflavin-5'-fosfat prin radicalul acidului fosforic și prin gruparea 3-imido, ca în formula:



deoarece flavinele substituite în poziția 3 nu formează sisteme enzimatice și sînt lipsite de activitate vitaminică (K u h n, 1936).

S c h r e c k e r și K o r n b e r g au separat din drojdie o enzimă denumită flavinmononucleotid adenil transferaza, care catalizează biosinteza FAD din FMN și ATP:

$$FMN + ATP \rightleftharpoons FAD + Ⓟ \sim Ⓟ + AMP$$

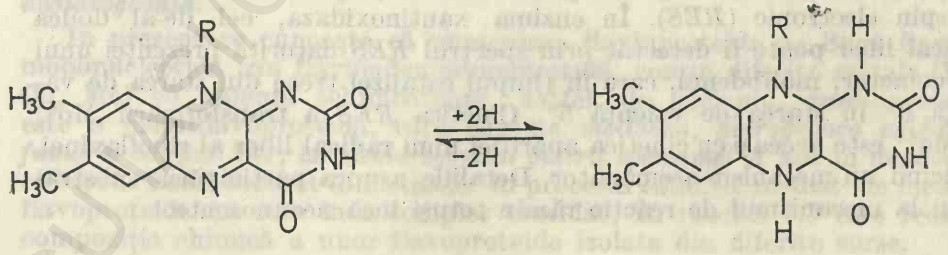
Metabolismul compușilor flavinici în drojdia de bere decurge probabil după schema:

$$\textit{Riboflavina} \underset{\text{Fosfataza}}{\overset{\text{Flavokinaza (ATP)}}{\rightleftharpoons}} FMN \underset{\text{Pirofosfataza}}{\overset{\text{FAD-Sintetaza (ATP)}}{\rightleftharpoons}} FAD$$

Cele două coenzime, FMN și FAD conțin în mod practic toată cantitatea de riboflavină prezentă în rinichiul de șobolan, iar sub formă dinucleotidică se găsesc aproximativ 70—90% din cantitatea totală de riboflavină din țesuturi.

Riboflavina și nucleotidele flavinice, ca derivați ai izoaloxazinei sînt ușor reduși cu formarea de leucoderivați (dihidroflavine). Reducerea flavinelor este un proces complicat, care se desfășoară în mai multe etape și la care participă radicali liberi de tipul semichinonelor.

Partea izoaloxazinică a enzimelor flavoproteice acționează în cazul dehidrogenazelor ca un sistem oxido-reducător reversibil: hidrogenul captat de la substrat se fixează la atomii de azot N_1 și N_{10}, enzima efectuînd transportul hidrogenului pe gruparea prostetică. Pentru refacerea enzimei nucleul flavinic trebuie reoxidat, ceea ce se realizează, de obicei, cu ajutorul unui sistem enzimatic, acceptor de hidrogen sau, în unele cazuri, în prezența oxigenului din aer.

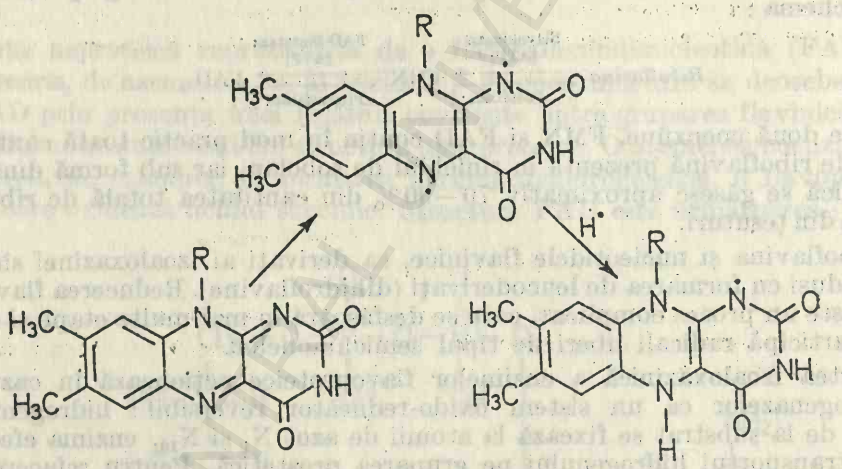


Activitatea biologică a acestor grupări prostetice din flavinenzime este datorată faptului că ele sînt implicate în importante reacţii de oxido-reducere. Principalele substrate sînt piridinnucleotidele reduse, α-amino şi α-hidroxiacizii, aldehidele şi unele combinaţii saturate ale carbonului. Gruparea prostetică a acestor enzime este uşor redusă de aceste substrate, activate de combinarea lor cu centrul activ al enzimei.

Flavoproteindinucleotidele pot fi oxidate de oxigenul molecular, dar în organism ele sînt, asemenea mononucleotidului, oxidate de citocromul c şi acest fapt explică de ce oxidarea *D*-aminoacizilor şi a acidului piruvic, la bacterii ce posedă citocromi, este complet inhibată de HCN. Cînd sistemul citocromic este absent, ca în cazul unor bacterii şi protozoare, oxidarea este efectuată de oxigenul molecular.

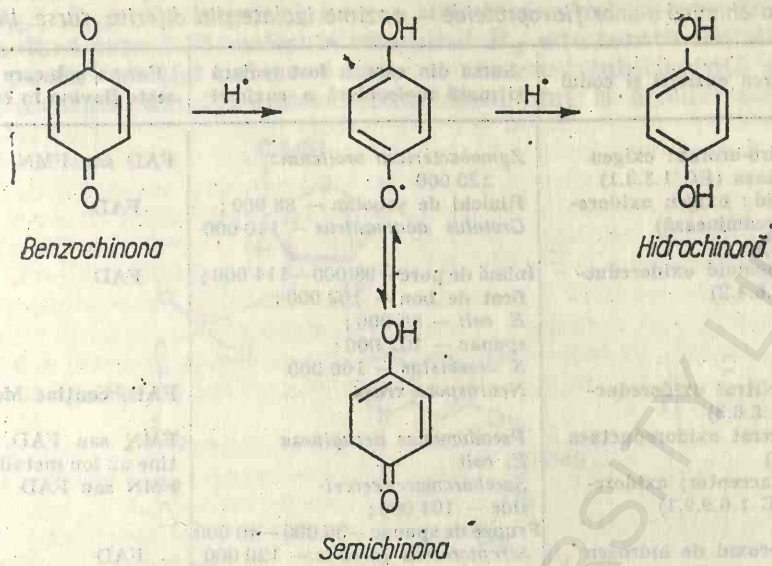
Conform teoriei lui K u h n şi S t r ö b e l e (1937), mecanismul reducerii, adiţia de hidrogen la nucleul central, se produce pe calea formării a trei compuşi intermediari: *verdoflavina* (verde-galben), *cloroflavina* (verde) şi *rodoflavina* (roşu-carmin).

Mecanismul molecular prin care riboflavina îşi exercită funcţia de grupare prostetică este încă incomplet elucidat. Studiile pe modele cu flavine şi compuşi structural înrudiţi au stabilit că reducerea flavinei se produce prin două procese de transfer a cîte unui singur electron:



Radicalul liber, intermediar, pare a fi o semichinonă, prin analogie cu semichinona formată din *p*-benzochinonă (v. pag 367, sus).

Aceşti radicali liberi pot fi puşi în evidenţă prin tehnica rezonanţei de spin electronic (*RES*). În enzima xantinoxidaza, cel de-al doilea radical liber poate fi detectat prin spectrul *RES* datorită prezenţei unui alt cofactor, molibdenul, care în timpul catalizei trece din starea de valenţă 6^+ în starea de valenţă 5^+. Cinetica *RES* a transformării Mo^{6+} în Mo^{5+} este aceeaşi cu cinetica apariţiei unui radical liber al riboflavinei, indicînd un mecanism asemănător. Detaliile asupra participării substratului la mecanismul de reacţie rămîn totuşi încă necunoscute.

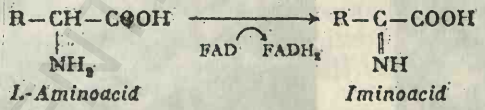


Funcţia de bază a flavoproteidelor în lanţul reacţiilor oxido-reducătoare ale respiraţiei celulare constă în *transportul electronilor* (şi hidrogenului) *de la coenzimele nicotinamidei reduse şi de la succinat la citocromi* :

$$NADP{-}H + 2(Fe^{3+})\ \text{Citocrom } c \underset{\text{Citocrom reductaza}}{\overset{\text{Flavoproteidă}}{\rightleftharpoons}} NADP^{+} + 2(Fe^{2+})\ \text{Citocrom } c + 2H^{+}$$

$$\text{Succinat} + 2(Fe^{3+})\ \text{Citocrom } c \underset{\text{Succinat dehidrogenaza}}{\overset{\text{Flavoproteidă}}{\rightleftharpoons}} \text{Fumarat} + 2(Fe^{2+})\ \text{Citocrom } c + 2H^{+}$$

FMN este un constituent obligatoriu al *citocrom-c-reductazei* şi *al dehidrogenazei L-aminoacizilor naturali*. Modul de acţiune al dehidrogenazei *L*-aminoacizilor poate fi reprezentat schematic astfel :



FAD îndeplineşte rolul de coenzimă pentru enzimele : *diaforaza, dehidrogenaza D-aminoacizilor, glicinoxidaza, xantinoxidaza* şi *butiril-CoA-dehidrogenaza.*

În prezent se cunoaşte că numeroase flavinproteide pe lîngă flavinmononucleotidă sau flavinadenindinucleotidă, conţin diferite metale (Fe, Cu, Mo) cu valenţă schimbătoare. Astfel, de exemplu, *xantinoxidaza* este o metalflavoproteidă, care conţine *molibden, hidrogenaza acidului fumaric* conţine fier, iar *dehidrogenaza butiril coenzimei A* are în molecula ei cupru. Rolul concret al metalelor în procesul catalitic mediat de metalflavoproteide nu este încă complet elucidat. În tabelul 8.3 este redată compoziţia chimică a unor flavoproteide izolate din diferite surse.

TABELUL 8.3

Compoziția chimică a unor flavoproteide — enzime izolate din diferite surse biologice

Denumirea enzimei și codul	Sursa din care a fost izolată și masa moleculară a enzimei	Forma sub care se găsește flavina în enzimă
L-5,6-Dihidro-orotat : oxigen oxidoreductaza (EC 1.3.3.1)	*Zymobacterium oroticum* : 120 000	FAD sau FMN
D-Aminoacid : oxigen oxidoreductaza (dezaminează) (EC 1.4.3.2)	Rinichi de șobolan — 88 900 ; *Crotalus adamanteus* — 140 000	FAD
NADH : lipoamid oxidoreductaza (EC 1.6.4.2)	Inimă de porc — 98 000 — 114 000 ; ficat de bou — 102 000 ; *E. coli* — 88 000 ; spanac — 102 000 ; *S. cerevisiae* — 100 000	FAD
NADPH : Nitrat oxidoreductaza (EC 1.6.6.3)	*Neurospora crasa*	FAD, conține Mo
NADH : Nitrat oxidoreductaza (EC 1.6.6.1)	*Pseudomonas aeruginosa* *E. coli*	FMN sau FAD, conține un ion metalic
NADPH : (acceptor) oxidoreductaza (EC 1.6.9.9.1)	*Saccharomyces cerevisiae* — 104 000 ; Frunze de spanac — 30 000 — 40 000	FMN sau FAD
NADH : Peroxid de hidrogen oxidoreductaza (EC 1.11.1.1)	*Streptococcus faecalis* — 120 000	FAD
L-Lactat : oxigen 2-oxidoreductaza (decarboxilează) EC 1.13.12.4)	*Mycobacterium phlei* — 260 000	FMN

Ariboflavinoza este ilustrată în figura 8.12.

Fig. 8.12. — Ariboflavinoza la șobolani : *a* — ulcerarea cavității bucale ; *b* — ulcerarea părții inferioare a membrelor.

8.3.5.7. Coenzimele cobamidice

În anul 1948, R i c k e s și a l ț i i izolează în stare pură din extractele de ficat, *un factor anti-pernicios* pe care îl denumesc vitamina B_{12}. Acest factor conține 4% cobalt, ceea ce reprezintă un atom de cobalt la o moleculă, și fosfor, într-o proporție echivalentă cobaltului.

Din diferite surse naturale au fost izolate mai multe vitamine B_{12} (B_{12a}, B_{12b}, B_{12c}, B_{12d}) care în principiu au o structură asemănătoare. După cum se vede din figura 8.13 molecula vitaminei B_{12} este constituită din patru nuclee pirolice parțial reduse și care au numeroși substituenți, dintr-un ribozid alcătuit din 5,6-dimetilbenzimidazol unit la atomul central de

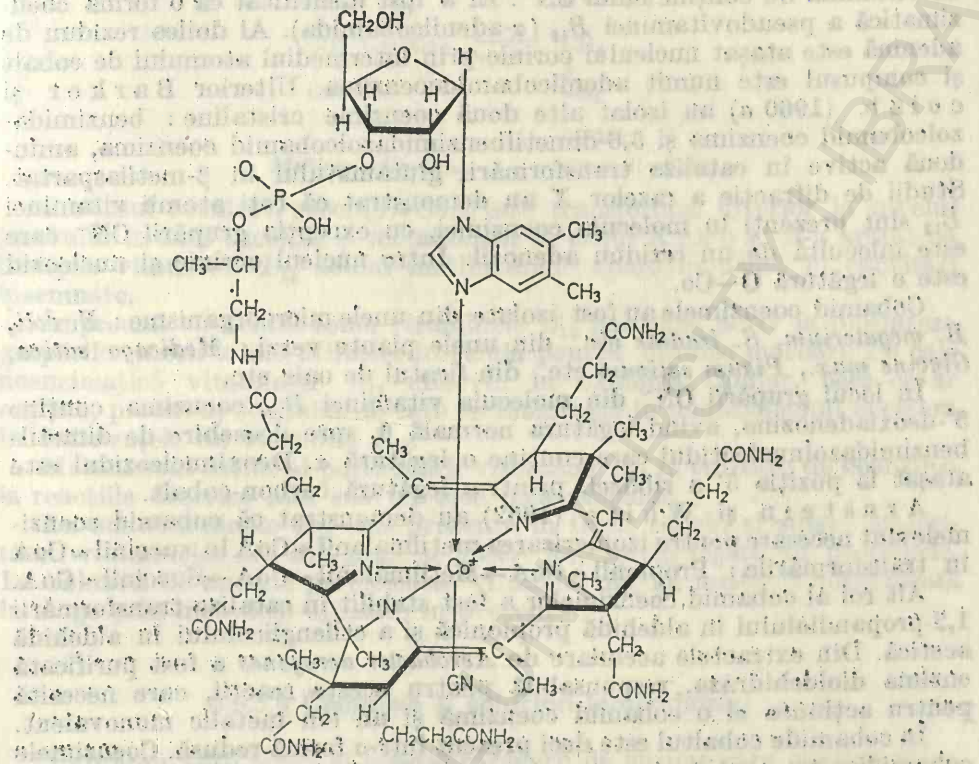


Fig. 8.13 — Structura chimică a vitaminei B_{12}.

cobalt, o moleculă de riboză fosforilată în C_3 și aminopropanol legat de o catenă laterală a ciclului *D* al nucleului tetrapirolic. Substituirea grupării cian din ciancobalamină cu o grupare de hidroxil dă naștere „hidroxicobalaminei", iar în cazul unei grupări nitro — la „nitrocobalamină". Activitatea biologică a acestor doi derivați este aproape identică cu cea a ciancobalaminei.

Hidrogenarea vitaminei B_{12} în prezența paladiului dă naștere vitaminei B_{12a}, care are o activitate biologică mai mică (1/5) decît vitamina B_{12}. În soluții ușor acide și sub influența luminii vitamina B_{12} se transformă în vitamina B_{12b}. Această transformare este reversibilă dacă vitamina B_{12b} este tratată cu cianură.

Vitaminele B_{12} acționează în organisme ca *factori de creștere* (microorganisme, vertebrate) și *factori cu acțiune antipernicioasă*, participînd totodată la menținerea integrității celulei nervoase. În anul 1958 în urma cercetărilor efectuate de Barker și alții, a fost pentru prima dată confirmată ipoteza că vitaminele B_{12} îndeplinesc rolul de coenzime.

Barker şi colab. (1960) au izolat din extractele acelulare de *Cl. tetanomorphum* un cofactor responsabil pentru transformarea glutamatului în β-metilaspartat. El conţine un mol de cobalt, un mol de reziduu fosfat, un mol de riboză, doi moli de adenină şi spre deosebire de vitamină nu conţine ionul CN^-. El a fost identificat ca o formă coenzimatică a pseudovitaminei B_{12} (α-adenilcobamida). Al doilea reziduu de adenină este ataşat nucleului corinic prin intermediul atomului de cobalt şi compusul este numit adenilcobamidcoenzima. Ulterior Barker şi colab. (1960 *a*) au izolat alte două coenzime cristaline: benzimidazolcobamid coenzima şi 5,6-dimetilbenzimidazolcobamid coenzima, amîndouă active în cataliza transformării glutamatului în β-metilaspartat. Studii de difracţie a razelor *X* au demonstrat că toţi atomii vitaminei B_{12} sînt prezenţi în molecula coenzimei, cu excepţia grupării CN^- care este înlocuită de un reziduu adenozil. Între nucleul corinic şi nucleozid este o legătură C—Co.

Cobamid coenzimele au fost izolate din unele microorganisme: *E. coli*, *B. megaterium*, *S. fradiae* etc., din unele plante verzi: *Medicago sativa*, *Glycine max.*, *Pisum sativum* etc., din ficatul de oaie etc.

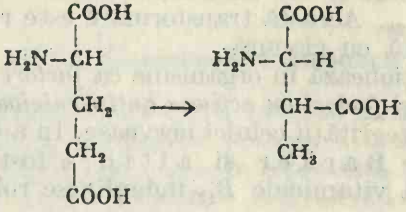
În locul grupării CN^- din molecula vitaminei B_{12}, coenzima conţine 5′-deoxiadenozina, avînd legătura normală β, spre deosebire de dimetilbenzimidazolnucleotidul care conţine o legătură α. Deoxinucleozidul este ataşat la poziţia 5′ a ribozei, printr-o legătură carbon-cobalt.

Arnstein şi White (1962) au demonstrat că cobamid coenzimele sînt necesare pentru izomerizarea metilmalonil ~ CoA în succinil ~ CoA în transformările: Propionil ~ CoA → Metilmalonil ~ CoA → Succinil ~ CoA.

Alt rol al cobamid coenzimelor a fost stabilit în cataliza transformării 1,2-propandiolului în aldehidă propionică şi a etilenglicolului în aldehidă acetică. Din extractele acelulare de *Aerobacter aerogenes* a fost purificată enzima dioldehidraza, responsabilă pentru aceste reacţii, care necesită pentru acţiunea ei o cobamid coenzimă şi un ion metalic monovalent.

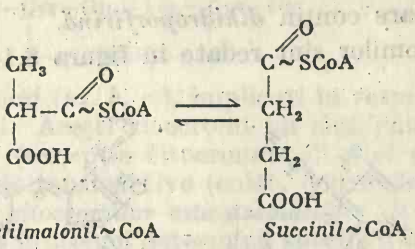
În cobamide cobaltul este deci prezent într-o formă redusă. Coenzimele cobamidice nu conţin gruparea cian în molecula lor. Cea mai răspîndită coenzimă este 5,6-dimetilbenzimidazolilcobamida, care a fost izolată din culturile bacteriene, din ficatul de bou, iepure, oaie, om, pui de găină şi din rinichiul de oaie. Sursa principală în obţinerea coenzimelor cobamidice rămîne culturile bacteriene şi îndeosebi culturile de *Propionobacterium shermanii* (tulpina ATCC 9614). Toate cele trei coenzime cobamidice sînt inactivate şi transformate în vitamină B_{12} de către razele solare şi de ionii cian.

La microorganisme, de exemplu, reacţia de transformare a acidului glutamic în acid β-metilaspartic este catalizată de coenzimă cobamidică necesară enzimei *L-treo-3-metilaspartat-carboxiaminometil mutaza* (EC 5.4.99):



Acid glutamic *Acid β-metilaspartic*

În ficatul de bou și de șobolan s-a evidențiat prezența metil-malonil-CoA-izomerazei (EC 5.5.99.2), care conține cobamidă și care realizează reacția :



Metilmalonil~CoA *Succinil~CoA*

Produsul rezultat, succinil~CoA, este transformat ulterior la nivelul țesutului în acid succinic și metabolizat în ciclul K r e b s. S-a arătat că în lipsa vitaminei B_{12} acidul metilmalonic apare în urină în cantități însemnate.

Împreună cu acidul folic, vitaminele B_{12} participă activ la biosinteza grupărilor metil labile utilizate în celulă pentru diferite metilări. Pe cale neenzimatică vitaminele B_{12} intervin în oxidarea tiolilor, ceea ce ar explica, probabil, schimbările care se manifestă în metabolismul acestora în deficiențele de vitamină B_{12}.

Mecanismul intim al participării vitaminei B_{12} în calitate de coenzimă la reacțiile descrise mai sus nu este încă elucidat.

La om vitaminele B_{12} sînt prezente în ficat, rinichi și sînge. Majoritatea vitaminelor B_{12} din sînge se găsesc sub formă legată cu proteinele. La bolnavii de anemie pernicioasă vitamina B_{12} nu poate fi identificată în sînge prin metodele utilizate în prezent.

8.3.5.8 Coenzime și cofactori feroporfirinici

Reprezentanții tipici ai acestei categorii de enzime care conține *cofactori de natură feroporfirinică* sînt *catalazele*, *peroxidazele* și sistemnl enzimatic care participă la procesele de oxidare celulară, reunit sub denumirea de *sistem citocromic*.

Citocromii descoperiți de D. K e i l i n formează o *grupă de hemoproteine intracelulare* cu *rol* deosebit de important *în procesul respirației celulare*, și se deosebesc între ei după spectrele de absorbție, gradul de afinitate față de oxigen și după natura chimică a cofactorului. Componenții sistemului citocromic au, în regiunea vizibilă, spectre de absorbție caracteristice. În funcție de dispoziția benzilor de absorbție, inițial, s-au diferențiat citocromii *a*, *b* și *c*. Ulterior, au fost descoperiți și alți citocromi, fenomen care a condus la împărțirea pe indici a acestor trei grupe (a_1, a_3, b_1, b_2, b_3, b_5, b_6 etc.). Astăzi, cînd se cunosc peste 20 de citocromi s-a ivit necesitatea unei clasificări și a unei nomenclaturi, unanim acceptată. Comisia de Enzimologie de pe lîngă Uniunea Internațională de Biochimie a recomandat clasificarea citocromilor în patru mari grupe *A*, *B*, *C* și *D*, în funcție de natura grupării prostetice :

A. — citocromi care au în calitate de cofactor *formilporfirina* ;

B. — citocromi care au în calitate de cofactor *protoporfirină* ;

C. — citocromi care au în calitate de cofactor *mezoporfirină substituită*, legată covalent cu proteina;

D. — citocromi care conțin *dihidroporfirină*.

Porfirinele citocromilor sînt redate în figura 8.14.

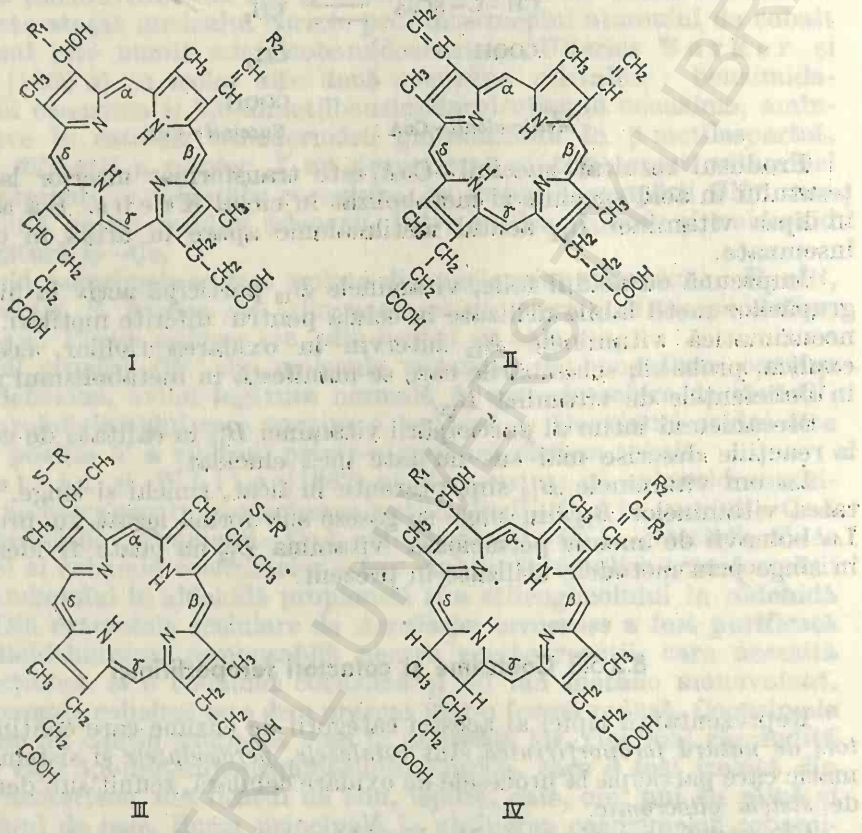
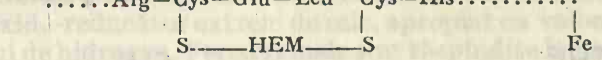


Fig. 8.14 — Componenta prostetică din structurile unor citocromi:
I — feroformilporfirina; II — feroprotoporfirina; III — feromezoporfixina și IV — ferodihidroporfirina.

O mare dificultate în studierea sistemului citocromic este faptul că majoritatea citocromilor sînt greu de solubilizat. În mod excepțional, citocromul *c* care este solubil, a fost extras, purificat și cristalizat. Citocromul *c*, izolat din inimă de cal, a fost foarte mult studiat. Spectrul formei reduse este neschimbat în întreg domeniul de *p*H, ceea ce demonstrează că între atomul de fier și cei patru atomi de azot ai porfirinei sînt legături covalente. Forma oxidată are cinci spectre diferite, la diverse valori de *p*H, punctele de tranziție indicînd valori de *pK* de 0,4—2,5—9,3 și 12,8.

În cazul citocromului *c*, izolat din inimă de cal și pentru care s-a determinat structura primară, hemul este legat covalent de proteină prin inter-

mediul a două resturi de cisteină și printr-o legătură suplimentară care se formează între restul unei molecule de histidină și atomul de fier.



Cei mai mulți citocromi (a_3, b, c_1), implicați în respirația celulară sînt localizați în mitocondrii. Acești citocromi nu sînt eliberați numai prin simplă extracție în apă (excepție citocromul *c*) ci ei sînt „solubilizați" prin tratare cu substanțe tensioactive (colat, deoxicolat etc.).

Modul de acțiune al citocromilor este asemănător cu cel al coenzimelor din structura lor. Natura proteinei determină specificitatea reacțiilor catalizate de diverși citocromi.

Formele reduse ale citocromilor sînt oxidate de citocromoxidază care este, de asemenea, o hemoproteidă ce conține citocrom a_3. Citocromoxidaza este inhibată de oxidul de carbon și cianura de potasiu, caz în care respirația celulară este anihilată în proporție de 80—90 %.

Descompunerea peroxidului de hidrogen este catalizată de un mare număr de substanțe. Catalizatorul cel mai eficient este enzima numită catalază (EC 1.11.1.6), care accelerează descompunerea apei oxigenate după ecuația :

$$2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$$

W a n g (1955) folosind un catalizator model (format prin combinarea trietilentetraaminei, TETA, cu ionul Fe^{3+}), propune un mecanism de acțiune, pe care-l consideră valabil și în cazul catalazelor naturale.

Considerații sterice au demonstrat că din punct de vedere energetic este improbabil ca în $(TETA)Fe(OH)_2^+$ cei patru atomi de N și ionul de Fe^{3+} să fie localizați în același plan. În acest complex, un atom de N aminic primar este situat deasupra, un altul, dedesubtul planului format de ceilalți 2 N aminici secundari și ionul de Fe^{3+}. Mecanismul detaliat al acțiuni catalitice a $(TETA)Fe(OH)_2^+$ este prezentat în figura 8.15. În prezența peroxidului de hidrogen, cei doi ioni OH^- prezenți în compusul I pot fi înlocuiți de ionul HOO^-, conducînd la formarea compusului II. Dar datorită faptului că lungimea legăturii O—O din HOO^- este de numai 1,3 Å, compusul II este instabil trecînd în compusul III. Scindarea directă a legăturii O—O dintr-o moleculă de H_2O_2 izolată necesită aproximativ 35 kcal/mol din energia de activare. În mecanismul discutat aici energia consumată în scindarea legăturii O—O este parțial compensată prin energia cîștigată în urma formării mai multor legături stabile Fe—O, deoarece atomul de O și ionul HO^- sînt acum liganzi separați și pot fi orientați pentru o mai bună suprapunere cu cei doi orbitali atomici hibrizi d^2sp^3 octaedrici liberi ai Fe^{3+}. Legarea atomului de O și a Fe^{3+} în compusul III nu se face, probabil, printr-o singură legătură covalentă, ca, mai implică, probabil, o legătură cu un electron, în plus față de legătura obișnuită cu doi electroni. Compusul III poate apoi ușor reacționa cu al doilea ion HOO^- pentru a produce O_2 și a regenera compusul I.

Între acest catalizator model și catalazele naturale există multe asemănări. Atît $(TETA)Fe(OH)_2^+$ cît și catalaza conțin Fe^{3+} și sînt inhibați de ioni CN^-. C h a n c e a demonstrat că și catalaza reacționează inițial

cu o moleculă de H_2O_2, formează un complex enzimă-substrat, care reacţionează cu o a doua moleculă de H_2O_2, producînd oxigen gazos şi regenerînd enzima. Mai mult, Chance a arătat că primul complex

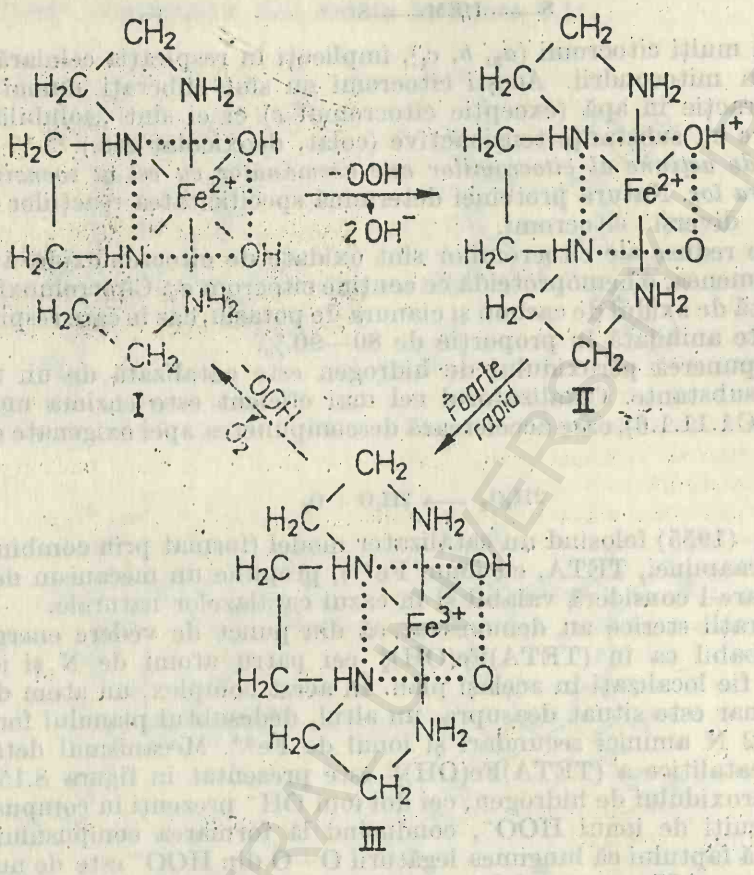


Fig. 8.15. — Mecanismul acţiunii catalitice a (TFTA) Fe $(OH)_2^+$ asupra descompunerii H_2O_2.

catalază-H_2O_2 reacţionează cu un exces de H_2O_2 formînd un al doilea complex enzimă-substrat, relativ stabil, care are o slabă tendinţă de a se descompune în O_2, H_2O şi enzimă liberă. În sistemul model prezentat compusul I este potenţial capabil de a se combina cu doi ioni HOO^- formînd $(TETA)Fe(OOH)_2$, compus relativ stabil, care manifestă o slabă tendinţă de a scinda legătura peroxidică prin mecanismul prezentat mai sus. Mai mult, Keilin şi Hartree au arătat că în prezenţa unor substanţe reducătoare, catalaza determină oxidări cuplate şi manifestă activitate peroxidazică. Structura compusului III indică faptul că el poate oxida şi alte molecule decît H_2O_2 şi astfel poate avea şi activitate peroxidazică.

8.3.5.9 Feredoxinele

Feredoxinele sînt cofactori care conţin fier sub formă neheminică, cu un potenţial oxido-reducător extrem de mic, apropiat ca valoare de potenţialul electrodului de hidrogen. Feredoxinele sînt răspîndite la bacteriile anaerobe, în cloroplastele unor plante superioare şi la bacteriile fotosintetizante. Ele sînt prezentate şi la unii micrococi, la reprezentanţii genului *Clostridium* şi chiar la bacteriile care nu fixează azot. Unele feredoxine au fost izolate şi obţinute în stare cristalizată (fig. 8.16), de exemplu, feredoxina bacteriei anaerobe fixatoare de azot *Clostridium pasteurianum*, care s-a dovedit a fi o metaloproteidă cu o masă moleculară de 6 000 daltoni, alcătuită din 55 resturi de aminoacizi şi conţinînd 7 atomi de fier, legaţi de partea proteică prin legături covalente la care participă resturile de cisteină.

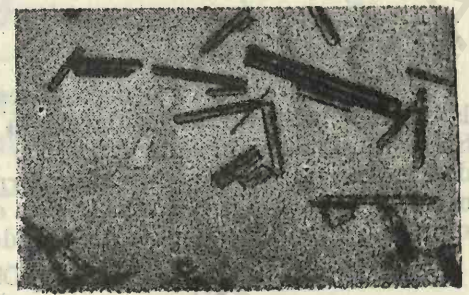


Fig. 8.16. — Feredoxina cristalizată din bacteria *Chromatium* (mărire × 795; după Buchanan şi Arnon, 1970).

Structura primară a părţii proteice a feredoxinei cristalizate din *Cl. pasteurianum* este următoarea (după Tanaka şi alţii, 1965):

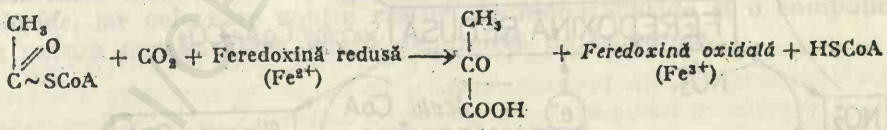
```
                5                  10                                  20
Ala-Tyr-Lys-Ile-Ala-Asp-Ser-Cis-Val-Ser-Cys-Gly-Ala-Cys-Ala-Ser-Glu-Cys-Pro-Val-

            25                  30                  35                  40
Asn-Ala-Ile-Ser-Gln-Gly-Asp-Ser-Ile-Phe-Val-Ile-Asp-Ala-Asp-Tre-Cys-Ile-Asp-Cys-Gly-

        45                  50                  55
-Asn-Cys-Ala-Asn-Val-Cys-Pro-Val-Gly-Ala-Pro-Val-Gln-Glu
```

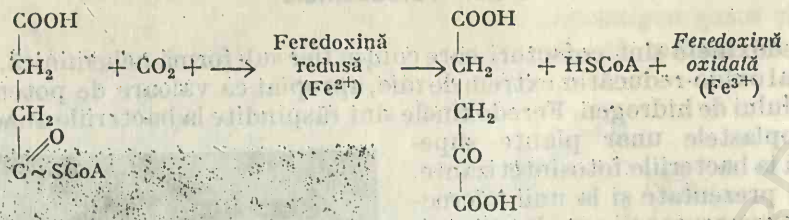
De remarcat că din cele 55 de resturi de aminoacizi opt resturi aparţin aminoacidului cisteina.

Feredoxina din *Cl. pasteurianum* şi din bacteria fotosintetizantă *Chromatium* participă la transportul de electroni şi la fixarea azotului molecular în cursul proceselor de fotosinteză. S-a dovedit că în sistemele enzimatice acelulare obţinute din aceste bacterii feredoxina redusă catalizează formarea piruvatului în cursul reacţiei:

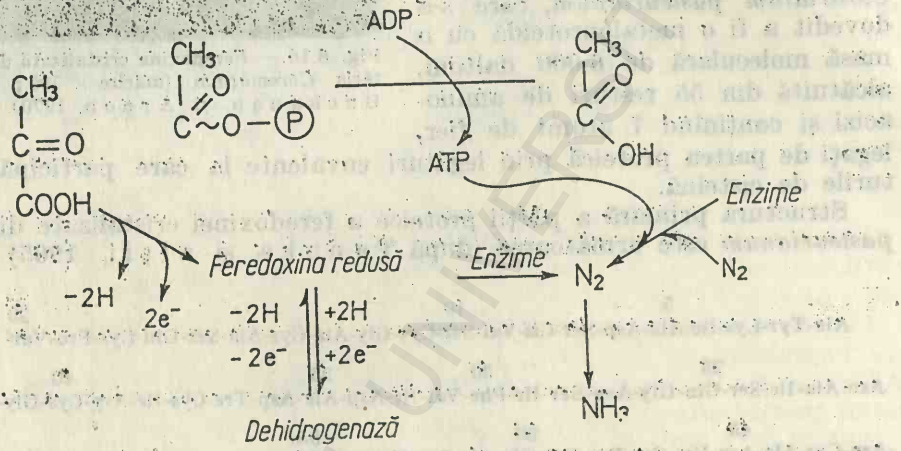


mediind fixarea dioxidului de carbon. Un sistem enzimatic acelular izolat de la bacteria fotosintetizantă *Chlorobium thiosulfatophilum*, în prezenţa feredoxinei reduse, catalizează de asemenea, fixarea CO_2 dar foloseşte

ca substrat succinilcoenzima A:



Cetoacizii formați pe această cale participă în procesul fotosintezei la fixarea azotului molecular și la transformarea acestuia în amoniac. Se presupune că în cursul acestor procese acidul piruvic este atît sursă de legături macroergice pentru formarea ATP cît și sursă de electroni necesari reducerii feredoxinei. Buchanan și Arnon (1970) presupun că funcțiile posibile ale feredoxinelor pot fi redate astfel:



Rolul feredoxinei în procesele de fotosinteză, de fixare a azotului molecular și de formare a amoniacului este redat în figura 8.17.

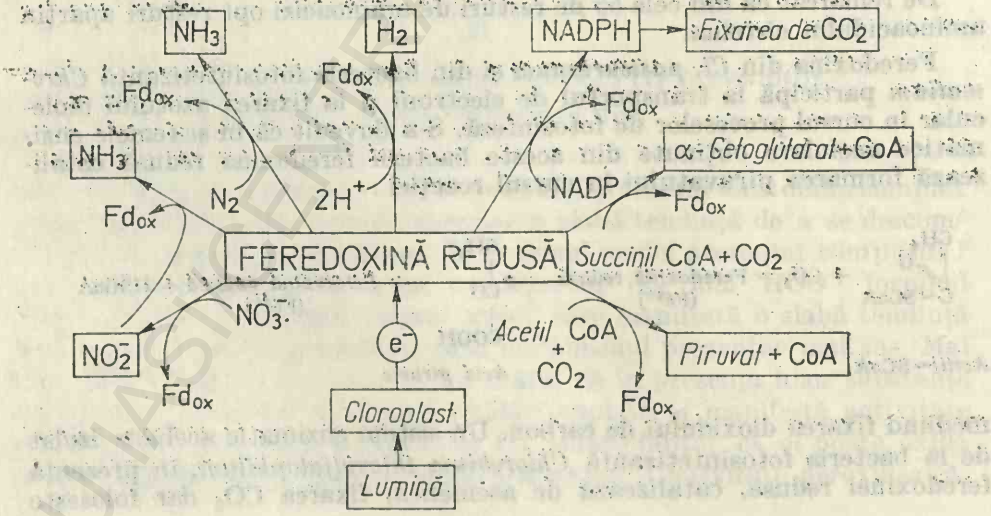
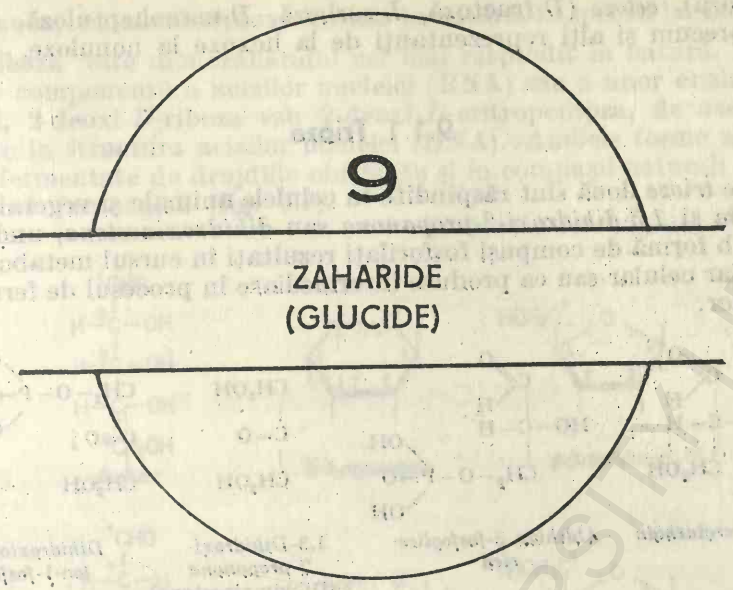


Fig. 8.17. — Rolul feredoxinei în diverse procese celulare.

Fd_{ox} feredoxină în stare oxidată.



Zaharidele alcătuiesc o clasă de substanţe organice *larg răspîndită în natură*, atît în *regnul vegetal*, unde formează aproximativ 50% din materia uscată a majorităţii organismelor vegetale superioare cît şi în *regnul animal*, unde se întîlnesc în cantităţi mai mici dar prezintă un interes deosebit prin funcţia lor biologică deosebită.

Reprezentanţii cei mai simpli ai zaharidelor sînt *monozaharidele* sau *monozele*, care în funcţie de numărul atomilor de carbon din moleculă se împart în *trioze*, *tetroze*, *pentoze*, *hexoze*, *heptoze* au un lanţ normal de atomi de carbon şi la C_1 sau C_2 prezintă o grupare carbonil, restul atomilor de carbon avînd valenţele satisfăcute cu hidrogen şi o grupare hidroxil. Cînd gruparea hidroxil este substituită printr-un atom de hidrogen sau printr-o grupare amino substanţa rezultată este un *deoxizahar* sau *aminozahar*. Unele monozaharide naturale prezintă un lanţ de atomi de carbon ramificat sau cu două grupări carbonil.

În stare naturală monozaharidele se găsesc fie libere, fie sub formă combinată, cînd moleculele sînt unite între ele prin *legături glicozidice* şi dau naştere la *oligozaharide* (*dizaharide*, *trizaharide*, *tetrazaharide* etc.) şi la *polizaharide* care sînt alcătuite din sute de resturi de monozaharide. Zaharidele care conţin în structura lor numai monozaharide se numesc *holozide*, iar cele care conţin resturi de monozaharide şi o componentă de natură nezaharidică poartă denumirea de *heterozide*.

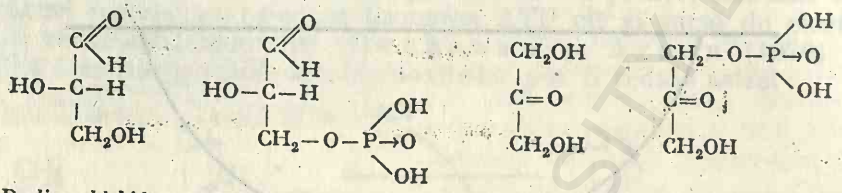
9.1 MONOZAHARIDE

Metodele moderne de investigaţie a extractelor vegetale şi animale au evidenţiat faptul că în materialul biologic se găsesc în stare liberă diferite *monozaharide*, *aldoze* (*D*-glucoza, *D*-xiloză, *D*-galactoză, *D*-manoză,

L-arabinoza), *cetoze* (*D*-fructoză, *L*-sorboză, *D*-manoheptuloză, sedoheptuloză) precum și alți reprezentanți de la hexoze la nonuloze.

9.1.1 Trioze

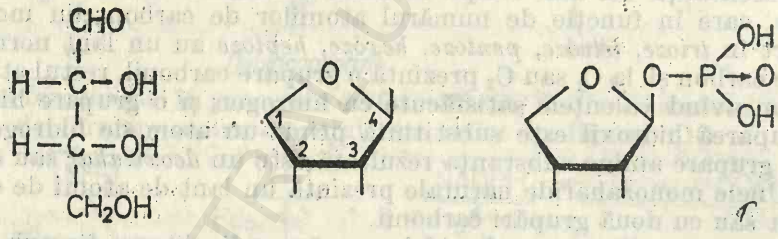
Dintre *trioze* două sînt răspîndite în celulele animale și vegetale, *D-gliceraldehida* și *1,3-dihidroxi-2-propanona* sau *dihidroxiacetona*, unde se întîlnesc sub formă de compuși fosforilați rezultați în cursul metabolismului intermediar celular sau ca produse intermediare în procesul de fermentare a hexozelor.



D-gliceraldehida — *Aldehida 3-fosfoglicerică* — 1,3-*Dihidroxi-2-propanona* (Dihidroxiacetona) — *Dihidroxiaceton-1-fosfat*

9.1.2 Aldotetroze

D-Eritroza este tetroza întîlnită ca produs intermediar fosforilat în degradarea enzimatică a zaharidelor.



D-eritroza — *β-D-eritrofuranoza* — *D-eritroza-4-fosfat*

9.1.3 Aldopentoze

D-Arabinoza este o pentoză frecvent întîlnită, îndeosebi, în structura glicozidelor și în fracția polizaharidică a bacilului tuberculozei. În stare liberă se găsește în cantități mici. Acest monozaharid nu este fermentat de drojdii.

L-Arabinoza este întîlnită în stare liberă numai în unele specii de conifere; sub formă combinată *L*-arabinoza se întîlnește în compoziția pectinelor, hemicelulozelor, gumelor, polizaharidelor bacteriene și a unor glicozide (v. mai departe).

L-Lixoza, monozaharid rar întîlnit în natură, în special în stare liberă.

D-Riboza este monozaharidul cel mai răspîndit în natură, îndeosebi ca parte componentă a acizilor nucleici (RNA) sau a unor enzime. Derivatul ei, 2-deoxi-*D*-riboza sau 2-deoxi-*D*-eritropentoza, de asemenea se întîlnește în structura acizilor nucleici (DNA). Ambele forme ale ribozei nu sînt fermentate de drojdiile obișnuite și în compușii naturali se găsesc sub formă furanozică (fig. 9.*1*).

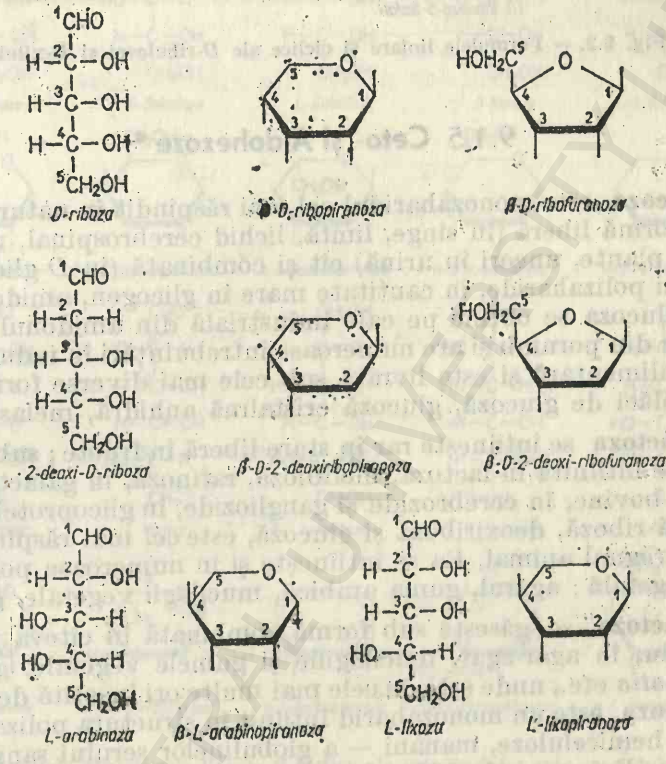


Fig. 9.1. — Formulele furanozice și piranozice ale *D*-ribozei, 2-deoxi-*D*-ribozei, *L*-arabinozei și *L*-lixozei.

9.1.4 Cetopentoze

D-Eritropentuloza sau *D-ribuloza* se întîlnește în organismele vii sub formă fosforilată, D-ribulozo-5-fosfat, fie ca produs intermediar al degradării oxidative a *D*-glucozei de către drojdii sau de țesuturile animale, fie ca produs inițial în procesul de fotosinteză la plante (v. capitolul 14).

Tot sub formă fosforilată la nivelul atomului C_5 se întîlnește în extractele bacteriene o altă cetopentoză *D-treo-pentuloză* sau *D-xiluloza*. Formulele lineare și ciclice ale acestor două pentuloze sînt redate în figura 9.2.

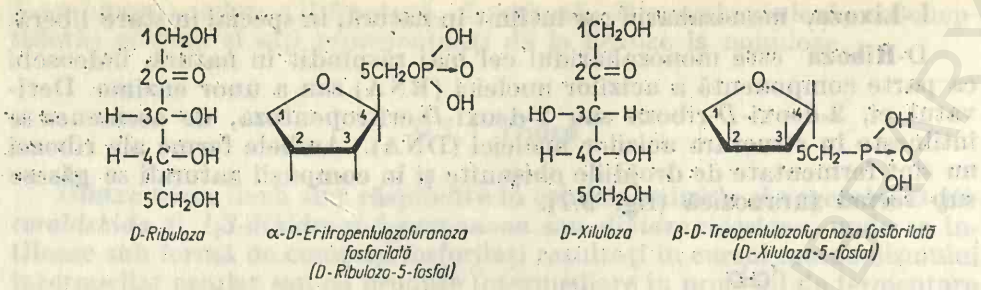


Fig. 9.2. — Formulele liniare și ciclice ale *D*-ribulozei și *D*-xilulozei.

9.1.5 Ceto- și Aldohexoze *

D-**Glucoza** este monozaharidul cel mai răspîndit în natură, găsindu-se atît sub formă liberă (în sînge, limfă, lichid cerebrospinal, miere, fructe, sucuri de plante, uneori în urină) cît și combinată (în *D*-glicozide, oligozaharide și polizaharide, în cantitate mare în glicogen, amidon și în celuloză). *D*-glucoza se obține pe cale industrială din amidonul obținut din cartofi sau din porumb și are numeroase întrebuințări în industria fermentativă și alimentară și este livrată sub cele mai diverse forme (sirop de glucoză, plăci de glucoză, glucoză cristalină anhidră, melasă etc.).

D-**Galactoza** se întîlnește rar în stare liberă în fructe ; sub formă combinată este întîlnită în lactoză, melibioză, rafinoză, în galactanii din pulmonul de bovine, în cerebrozide și gangliozide, în glicoproteine. *D*-galactoza, după riboză, deoxiriboză și glucoză, este cel mai răspîndit monozaharid din regnul animal. Ea se întîlnește și în numeroase polizaharide de origină vegetală : agarul, guma arabică, mucilagii vegetale, glicozide etc.

L-**Galactoza** se găsește sub formă combinată în cîteva polizaharide, de exemplu, în agar-agar, mucilagiile și gumele vegetale, galactanii din *Helix pomatia* etc., unde este de cele mai multe ori însoțită de *D-galactoză*.

D-**Manoza** este un monozaharid întîlnit în structura polizaharidelor — mucilagii, hemiceluloze, manani — a globulinelor serului sanguin, în ovomucoid ș.a. Este un zahar fermentat ușor de drojdii.

D-**Fructoza** denumită și levuloză este întîlnită în stare liberă în miere, în sucul unor fructe, în mere, tomate etc., iar sub formă combinată în structura zaharozei, a inulinelor care constituie rezerva polizaharidică a unor plante din familia *Compositeae*, în unele oligozaharide. În produsele naturale fructoza este prezentă sub formă furanozică. În celulele animale se întîlnesc derivați fosforilați ai fructozei, fructozo-6-fosfat și fructozo-1,6-difosfat, ca produși intermediari în calea metabolică Embden-Meyerhof de degradare anaerobă a glucozei.

L-**Soroboza** este o aldohexoză care se întîlnește în hidrolizatele pectinei izolate din fructele de *Passiflora*, precum și sucurile fermentative de *Sor-*

* Formulele structurale sînt redate în figura 9.3.

bus aucuparia. În industrie se folosește în cantități apreciabile pentru sinteza acidului ascorbic și se obține prin fermentarea D-glucitolului de către *Acetobacter suboxydans*, cu randamente cuprinse între 75 și 90%.

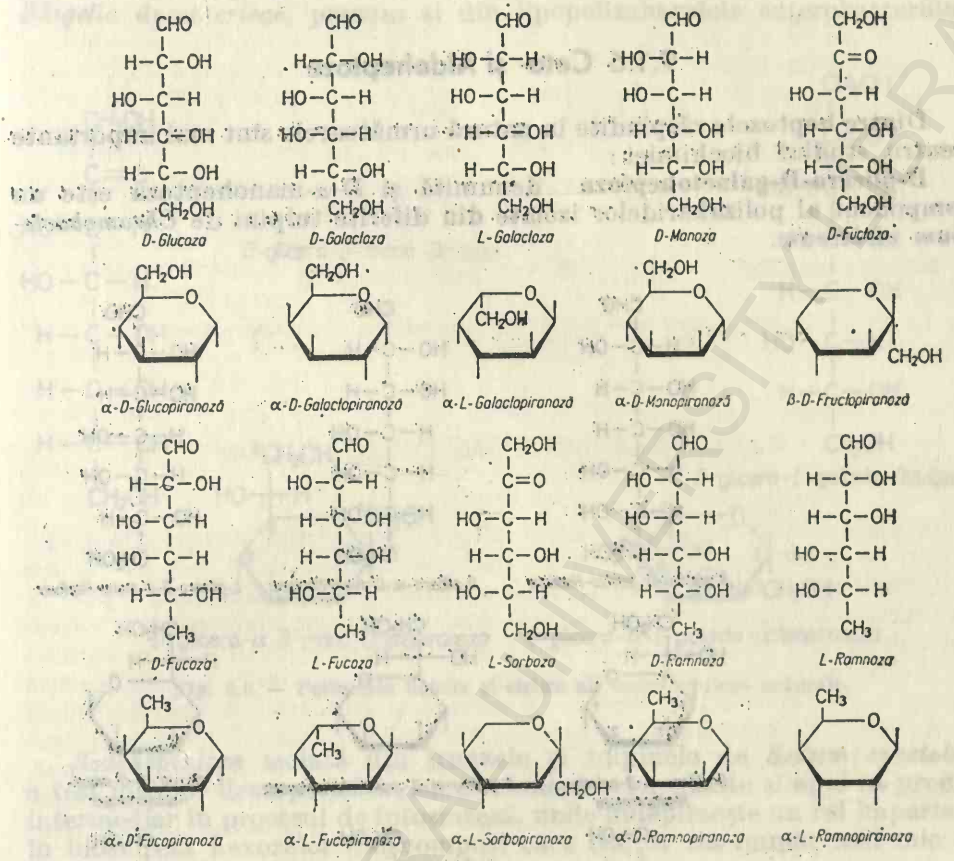


Fig. 9.3. — Formulele structurale liniare și ciclice ale principalelor ceto- și aldohexoze întîlnite în stare liberă sau sub formă combinată, în celulele vegetale și animale.

D-Fucoza denumită și 6-deoxi-*D*-galactoza sau *D*-rodeoza se întîlnește în structura glicozidelor cardiace, în rădăcinile unor plante din familia *Convolvulaceae* sub formă de glicozide cu acțiune purgativă.

L-Fucoza este mult mai răspîndită decît *D*-fucoza și se găsește în oligozaharidele din lapte, în substanțele specifice grupelor sanguine, glicoproteine, în ouăle ursinului de mare și în unele alge marine, de exemplu, în *Fucus vesiculosus*.

L-Ramnoza este un monozaharid întîlnit aproape exclusiv sub formă combinată; existența lui în stare liberă este îndoielnică deși a fost iden-

tificat în extractele din frunzele de *Rhus toxicodendron*. Se găsește în numeroase glicozide, în gume, mucilagii și în polizaharidele compușilor cu proprietăți imunologice din bacterii. În polizaharidele capsulei bacteriilor gram negative ale tulpinei *GS* se întîlnește și *D*-ramnoză.

9.1.6 Ceto- și Aldoheptoze

Dintre heptozele răspîndite în natură următoarele sînt mai importante pentru studiul biochimiei :

D-glicero-D-galactoheptoza denumită și D-α-manoheptoza este un component al polizaharidelor izolate din diferite tulpini de *Chromobacterium violaceum*.

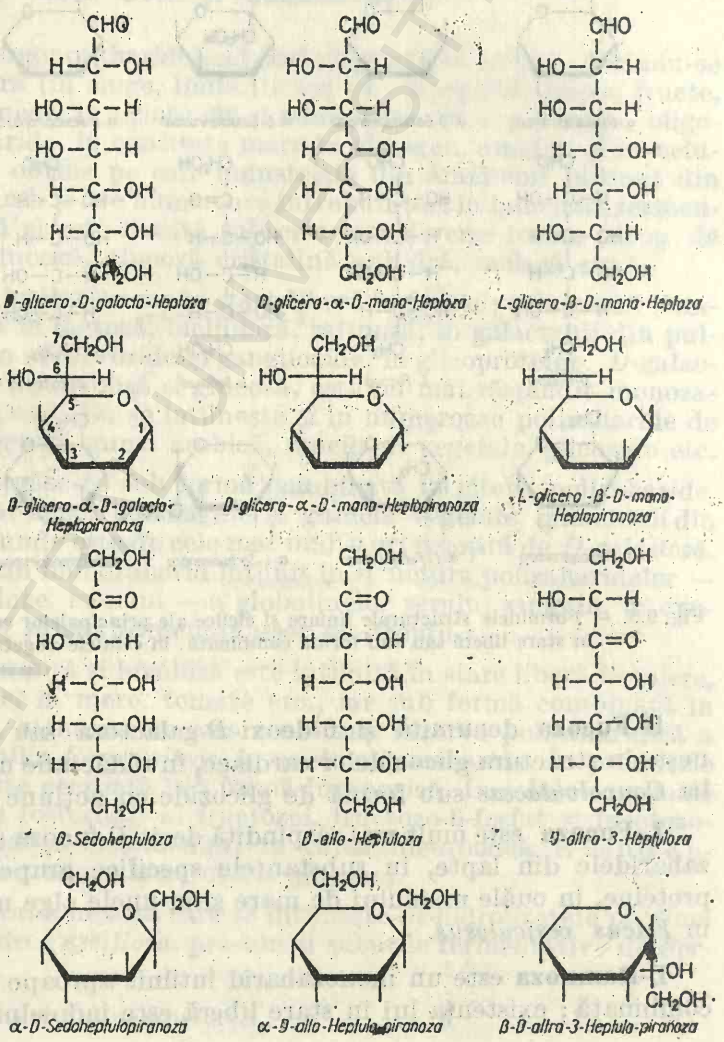


Fig. 9.4. — Formulele structurale lineare și ciclice ale principalelor ceto- și aldoheptoze naturale.

D-glicero-D-mano-heptoza a fost izolată din lipopolizaharidele peretelui celular al enterobacteriilor, din rădăcinile de *Primula officinalis* și din drojdiile de fermentație în care se găsește sub formă de guanozin-5'-glicozil pirofosfat. *L-glicero-D-mano heptoza* a rezultat prin hidroliza polizaharidelor izolate din *Escherichia coli* și diferite tulpini ale speciei *Shigella dysenterieae*, precum și din lipopolizaharidele enterobacteriilor.

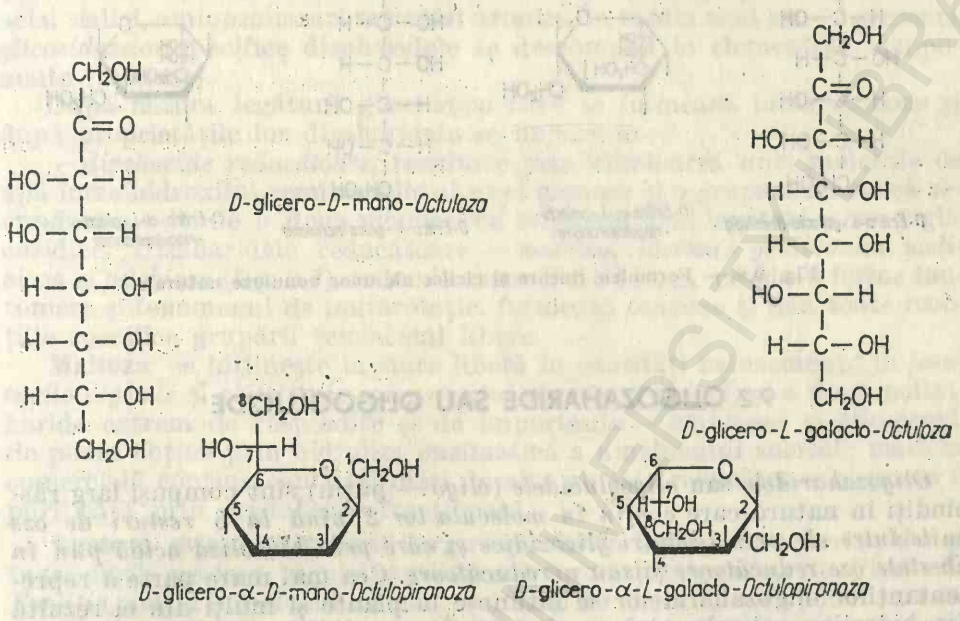


Fig. 9.5. — Formulele lineare și ciclice ale unor octuloze naturale.

Sedoheptuloza izolată din frunzele și tulpinele de *Sedum spectabile* a fost ulterior descoperită în sucul numeroaselor plante și apoi ca produs intermediar în procesul de fotosinteză, unde îndeplinește un rol important în biosinteza hexozelor din compuși care conțin un număr mai mic de atomi de carbon.

D-allo-heptuloza a fost izolată din rădăcinile de *Primula officinalis* împreună cu *D-allo-3-heptuloza*; ultima a fost obținută pe cale cromatografică și din fructele și tulpinile de *Coriana japonica*.

Formulele structurale ale ceto- și aldoheptozelor sînt redate în figura 9.4.

Dintre monozaharidele care conțin opt atomi de carbon au fost izolate numai două ceto-octoze: *D-glicero-L-gala octuloza*, obținută din rădăcinile uscate de *Primula officinalis*, din cîteva genuri ale familiei *Crasulaceae* și din *Persea gratissima* și *D-glicero-D-mano octuloza* extrasă din *Sedum spectabile* și *Primula officinalis* (fig. 9.5).

Tot de la diferite specii din familiile *Lauraceae* și *Crasulaceae*, în special, din *Primula officinalis* și din *Sedum spectabile*, au fost izolate monozaharide cu nouă atomi de carbon. Formulele lor structurale și denumirile sînt date în figura 9.6.

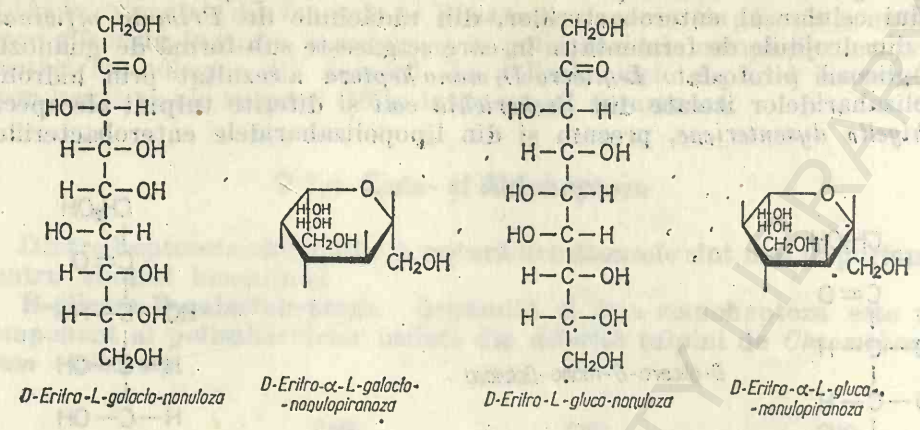


Fig. 9.6. — Formulele lineare și ciclice ale unor nonuloze naturale.

9.2 OLIGOZAHARIDE SAU OLIGOGLUCIDE

Oligozaharidele sau *oligoglucidele* (*oligo* — puțin) sînt compuși larg răspîndiți în natură care *conțin în molecula lor 2 pînă la 6 resturi de oze unite între ele prin legături glicozidice și care prin hidroliza acidă pun în libertate oze reducătoare și/sau nereducătoare*. Cea mai mare parte a reprezentanților oligozaharidelor se întîlnesc în plante și mulți din ei rezultă din hidroliza polizaharidelor naturale. În acest sens cele mai cunoscute exemple sînt *maltoza*, *izomaltoza* și *celobioza* care rezultă prin hidroliza amidonului, dextranului și, respectiv, a celulozei. Alte numeroase oligozaharide rezultă din hidroliza *heterozaharidelor de origină microbiană, vegetală și animală*. Din această grupă de zaharuri fac parte și *hetero-oligozaharidele*, substanțe alcătuite din resturi de diferite monozaharide : pentoze, hexoze, hexozamină, deoxihexoze, acizi uronici.

Criteriile pe baza cărora pot fi clasificate oligozaharidele sînt numeroase : *tipul grupărilor funcționale, numărul unităților monomerice, tipul resturilor de monomeri, natura monomerilor* (reducători și nereducători). Fiecare categorie de oligozaharide poate fi la rîndul ei subdivizată pe baza altor criterii de referință, de exemplu, în *homo-oligozaharide*, alcătuite dintr-un singur fel de resturi de monozaharid și *hetero-oligozaharide* formate din două sau mai multe feluri de resturi de monozaharide.

Oligozaharidele sînt compuși ușor solubili în apă și în alți solvenți polari. În prezența solvenților organici nepolari oligozaharidele precipită sub formă amorfă sau cristalizată. Oligozaharidele reducătoare în soluții apoase prezintă fenomenul de *mutarotație*. În stare pură oligozaharidele sînt *inodore*, majoritatea sînt *dulci la gust*, la temperaturi mari *se deshidratează*, dînd produși cu miros asemănător caramelului. Diferite oligozaharide vegetale și animale sînt folosite în industria alimentară și în industria chimică și fermentativă.

9.2.1 Dizaharide

Dizaharidele, denumite și *oligoglucide* sau *dioze* sînt *alcătuite din hexoze* sau *din hexoze și pentoze unite între ele printr-o legătură glicozidică* la formarea căreia participă hidroxilul glicozidic al unei monoze și un hidroxil oarecare al celei de a doua monoze. În unele dizaharide se întîlnesc și acizi sialici, aminozaharuri sau acizi uronici. În mediu acid sau în prezența *glicozidazelor* specifice dizaharidele se descompun în elementele componente (monoze).

După natura legăturii glicozidice care se formează între monoze și după proprietățile lor dizaharidele se împart în :

— *dizaharide reducătoare*, rezultate prin eliminarea unei molecule de apă între hidroxilul semiacetalic al unei monoze și o grupare alcoolică secundară a celei de a doua monoze, cu formarea unei legături α sau β-glicozidice. Dizaharidele reducătoare — *maltoza*, *lactoza*, *gentiobioza*, *melibioza* și *celobioza* (fig. 9.7), reduc licoarea F e h l i n g, prezintă forme tautomere și fenomenul de mutarotație, formează ozazone și dau toate reacțiile specifice grupării semiacetal libere.

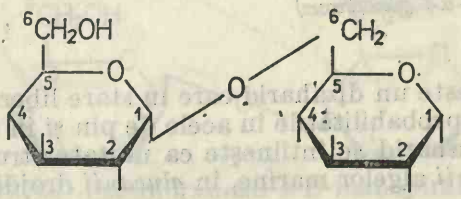
Maltoza se întîlnește în stare liberă în cantități neînsemnate în *țesuturile vegetale* și constituie *componentul structural principal* a două polizaharide extrem de răspîndite și de importante — *amidonul* și *glicogenul*. Se poate obține prin hidroliza enzimatică a amidonului solubil ; maltoza comercială conține cantități mari de alte glucide reducătoare și poate fi purificată prin cristalizare fracționată.

Lactoza este un dizaharid larg răspîndit în *laptele mamiferelor, dar și în țesuturile acestora* în mici cantități sub formă de oligozaharide. Florile de *Forsitia* conțin în polenul lor mici cantități de lactoză, care pot fi extrase cu alcool metilic. Cantități apreciabile de lactoză pură se obțin în procesul de fabricare a brînzeturilor din zer și în funcție de condițiile de cristalizare se obțin diferite forme cristaline ale lactozei.

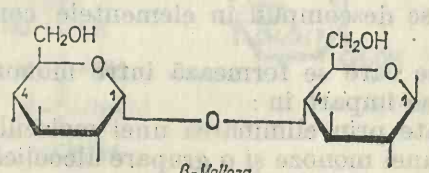
Gentiobioza în stare liberă se găsește rar în natură ; ea este un dizaharid care se întîlnește în structura β-*D*-glucanilor din drojdii, acidului luteic din *Penicillium*, a amigdalinei și crocinei, a trizaharidului genționoza izolat din rădăcinile de *Gentiana* etc.

Celobioza este în principal un constituent al diferitelor polizaharide — *celuloză*, *lichenan*, *laminaran* etc.—și al numeroaselor glicozide vegetale. Nu este fermentată de drojdii. În laboratoarele de chimie și biochimie este *utilizată ca reactiv chimic*.

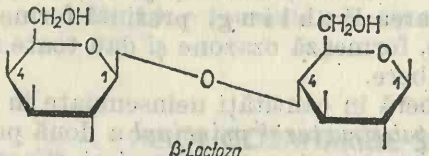
Izomaltoza este un dizaharid care se întîlnește ca unitate structurală în *amilopectină* și *glicogen*, în numeroase polizaharide de origină bacteriană. Nu se găsește liberă în natură și nu este fermentată de drojdii. În cantități



convenabile se obține prin hidroliza enzimatică a dextranului izolat din *Leuconostoc mesenteroides*, a amilopectinei ș.a. Izomaltoza este o 6-*O*-α-*D*-glucopiranozil-*D*-glucopiranoză cu proprietăți reducătoare, iar structura ei a fost confirmată prin sinteza în laborator prin condensarea 1,2,3,4-tetra-*O*-acetil-*D*-glucopiranozei și clorurii de 3,4,6-tri-*O*-acetil-2-*O*-nitro-β *D*-glucopiranozil.

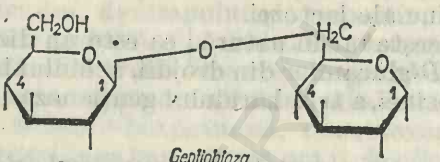


β-Maltoza
(4-O-α-D-glucopiranozil-D-glucopiranoza)
4-O-α-D-Glc-p-D-Glc-p

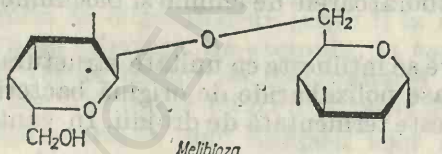


β-Lactoza
(4-O-β-D-galactopiranozil-D-glucopiranoza)
4-O-β-D-Gal-p-D-Glc-p

Celobioza
(4-O-β-D-glucopiranozil-D-glucopiranoza)
4-O-β-D-Glc-p-D-Glc-p



Gențiobioza
[6-(β-D-glucopiranozil-D-glucopiranoza)]

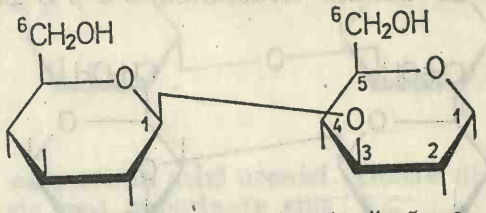


Melibioza
(6-glucopiranozil-α-D-galactopiranoza)

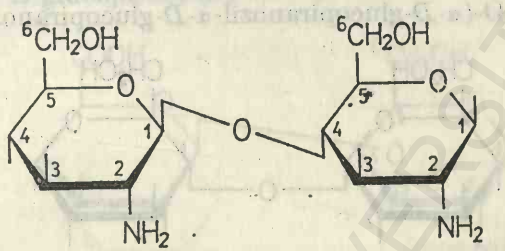
Fig. 9.7. — Formulele de structură ale diozelor reducătoare. *Maltoza* se întîlnește în stare liberă în cantități relativ mici în plante ; în ficatul mamiferelor maltoza este prezentă, dar reprezintă, probabil, o fază intermediară în degradarea glicogenului. Cantități însemnate de maltoză rezultă în procesul de degradare enzimatică a amidonului sub acțiunea amilazelor. Este o dioză puternic dextrogiră, ușor fermentată de drojdii. *Lactoza* este o dioză de origine animală, găsindu-se în laptele mamiferelor și femeii unde formează 4 — 5 %. Prin hidroliză, în prezența lactazei, pune în libertate cîte o moleculă de glucoză și galactoză. Nu este fermentată de drojdii. *Celobioza* — dioză hidrolizată de emulsină-enzimă prezentă în migdalele amare — se găsește extrem de rar sub formă liberă în plante, dar ea este unitatea structurală de bază a celulozei. Toate cele trei dioze de mai sus conțin legături glicozidice α-1→4 spre deosebire de gențiobioză în care legătura glicozidică este de tipul β-1→6. *Gențiobioza* nu se găsește în cantități mari în stare liberă în natură ci rezultă prin hidroliza glicozidului *amigdalina* și a triozei — *gențianoza*. În rădăcinile de *Gentiana lutea* și fructele de *Terminalia chebula* au fost identificate mici cantități de gențiobioză liberă. *Melibioza* nu se găsește în stare liberă în natură, dar este o componentă a triozei vegetale rafinoza.

Laminaribioza este un dizaharid care în stare liberă se găsește extrem de rar, după toate probabilitățile în acele de pin și în semințele de *Cycas*. Frecvent acest dizaharid se întîlnește ca unitate structurală de bază în *laminaran*, *lichenanii* algelor marine, în *glucanii* drojdiilor etc.

Laminaribioza este o 3-*O*-β-D-glucopiranozil-*D*-glucopiranoză reducătoare, nefermentată de drojdii și structura ei chimică a fost confirmată prin sinteză:

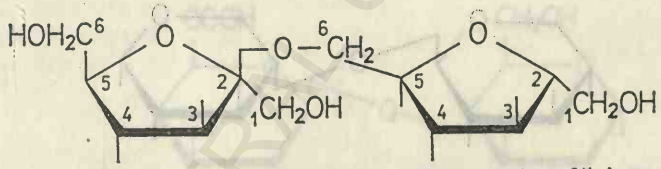


Chitobioza este un dizaharid cu structură de 2-amino-2-deoxi-4-*O*-(2-amino-2-deoxi-β-D-glucopiranozil)-β-*D*-glucopiranoză și derivatul ei N-N'-diacetilat este unitatea structurală fundamentală a polizaharidului denumit *chitina* extrem de răspîndit în lumea vie, atît la plante cît

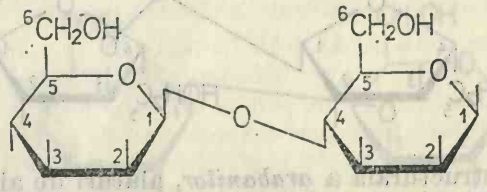


și la animale. Se obține prin hidroliza acidă a chitinei, urmată de acetilare sau prin acetoliza chitinei de diverse proveniențe.

Inulobioza se caracterizează prin faptul că este un dizaharid alcătuit din două resturi de fructoză, din punct de vedere chimic fiind 2-*O*-β-*D*-fructofuranozil-6 *D*-fructofuranoză și se întîlnește în stare liberă în *Helianthus tuberosus*, iar în calitate de componentă structurală în polizaharidele *inulina*, *graminan*, *irisan* — fructani de rezervă izolați din trufa albă, graminee și, respectiv, din irișI.

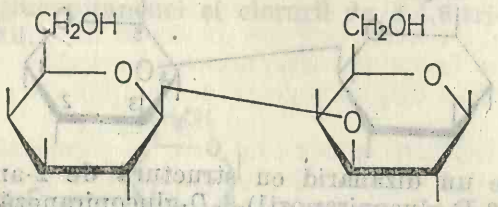


Manobioza este un dizaharid cu proprietăți reducătoare, izolat în mari cantități din polizaharidele de origină vegetală — *manani*, *galactomanani*, *glucomanani* etc. unde se întîlnește sub formă de unitate constitutivă repetitivă. Formula ei structurală este următoarea:

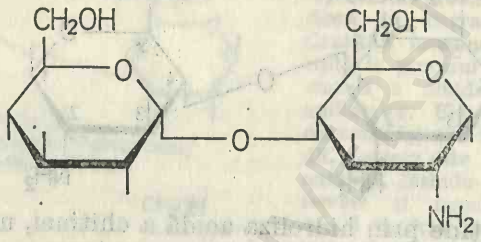


reprezentînd o 1-*O*-β-*D*-manopiranozil-4-*D*-manopiranoză.

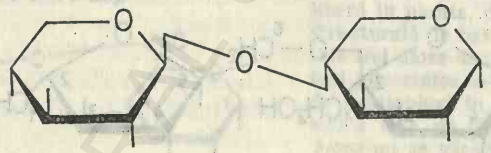
Alte dizaharide. În agar-agarul izolat din algele marine precum și în structura diferitelor gume vegetale sau a galactanilor *D* izolați din ouăle de șarpe se întîlnește ca unitate structurală 3-*O*-β-*D*-galactopiranozil-*D*-galactopiranoza :



după cum în structura *heparinei*, un polizaharid larg răspîndit în țesuturile mamiferelor se întîlnește sub formă N-sulfatată sau *O*-sulfatată dizaharidul 2-amino-2-deoxi-4-O-(α-*D*-glucopiranozil-α-*D*-glucopiranoza :

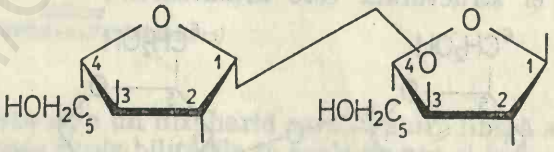


Dizaharide care conțin resturi de pentoze. Cel mai răspîndit dizaharid în structura căruia întîlnim pentoze este *xilobioza* o 4-O-β-*D*-xilopiranozil-*D*-xilopiranoză reducătoare, nefermentată de drojdii, componentă structu-



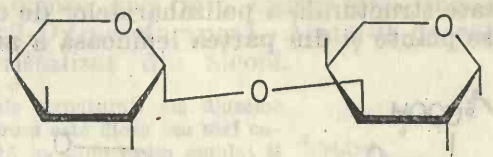
rală importantă a polizaharidelor vegetale întîlnite în pereții celulari ai ierburilor, copacilor, algelor, semințelor cerealelor etc., polizaharide de tipul : *D*-xilani, *L*-arabino-*D*-xilani, *D*-glucurono-*D*-xilani ș.a.

În structura arabanilor răspîndiți îndeosebi în plantele de sfeclă de zahăr se întîlnește dizaharidul 3-O-β-*L*-arabinofuranozil-*L*-arabinofuranoza :



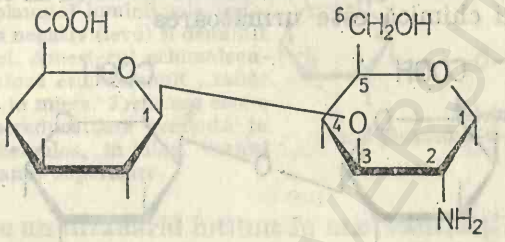
care este unitatea structurală a *arabanilor*, alături de alt dizaharid care constituie componenta majoră a acestora — 3-O-β-*L*-arabinopiranozil-*L*-

-arabinopiranoza :

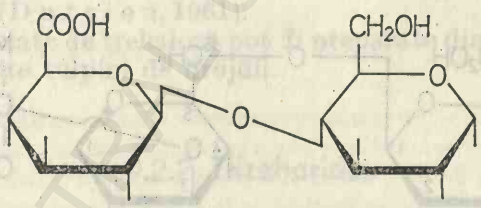


Dizaharide care conţin acizi uronici. Dintre dizaharidele care conţin acizi uronici cele mai importante sînt :

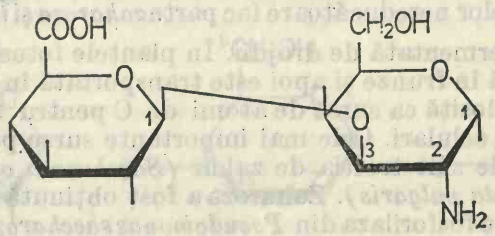
Acidul hialobiuronic ai cărui derivaţi N-acetilaţi se întîlnesc în *acidul hialuronic* larg răspîndit în ţesuturile mamiferelor unde îndeplineşte variate funcţii. Acidul hialobiuronic este O-2-amino-2-deoxi-3-O-(β-*D*-glucopiranuronozil)-*D*-glucopiranoză :



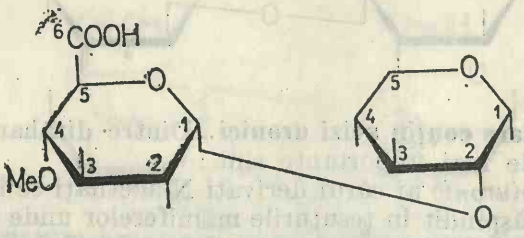
Acidul celobiouronic — component structural al polizaharidelor care intră în structura capsulelor de *Pneumococcus* şi component minor al polizaharidelor vegetale este o 4-O-β-*D*-glucopiranuronozil-*D*-glucopiranoză :



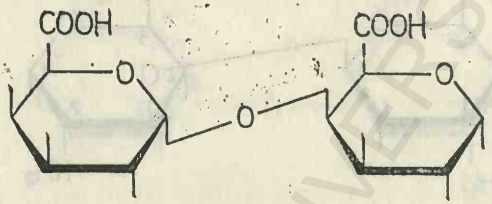
Chondrozina este un dizaharid ai cărui derivaţi N-acetilaţi sau O-sulfataţi la nivelul atomilor C_4 şi C_6 ai hexozaminei se întîlnesc în structura condroitin-4-sulfaţilor şi condroitin-6-sulfaţilor. Structura lui chimică s-a dovedit a fi o 2-amino-2-deoxi-3-*O*-(β-*D*-glucopiranuronozil)-*D*-galactopiranoză :



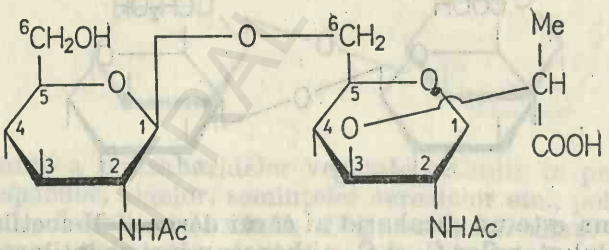
2-O-(4-O-Metil-α-D-glucopiranuronozil-D-xilopiranoza este un dizaharid întîlnit ca unitate structurală a polizaharidelor de origine vegetală, izolate din numeroase plante și din partea lemnoasă a arborilor.



Acidul 4-O-α-D-Galactopiranuranozil-D-galactopiranuronic este unitatea structurală de bază a polizaharidelor care intră în structura pectinelor și structura lui chimică este următoarea :



Acidul 6-β-N-acetilglucozaminil-N-acetilmuramic este un dizaharid care se întîlnește, îndeosebi, în glicopeptidele peretelui celular al microorganismelor gram-pozitive, cu următoarea structură chimică :



— ***dizaharide nereducătoare*** rezultate teoretic prin eliminarea unei molecule de apă dintre hidroxilul semiacetalic al ambelor resturi de oze, cu formare de legături de tipul α,α- ; β,β— ; α,β— și β, α-glicozidice. Din categoria dizaharidelor nereducătoare fac parte *zaharoza* și *trehaloza* (fig. 9.8).

Zaharoza este fermentată de drojdii. În plantele fotosintetizante zaharoza este sintetizată în frunze și apoi este transportată în diferite părți ale plantei unde este folosită ca sursă de atomi de C pentru sinteza celor mai diferiți componenți celulari. Cele mai importante surse pentru prepararea zaharozei comerciale sînt trestia de zahăr *(Saccharum officinarum* L.) și sfecla de zahăr *(Beta vulgaris)*. Zaharoza a fost obținută și prin sinteza *in vitro*, folosindu-se fie fosforilaza din *Pseudomonas saccharophila*, fie sucraza,

fie invertaza din fungii. Pe cale de laborator zaharoza a fost obținută cu randamente mici prin condensarea triacetil-α-*D*-glucopiranozei cu tetraacetil-*D*-fructofuranoza. Acetatul de zaharoză rezultat este deacetilat și cristalizat din alcool.

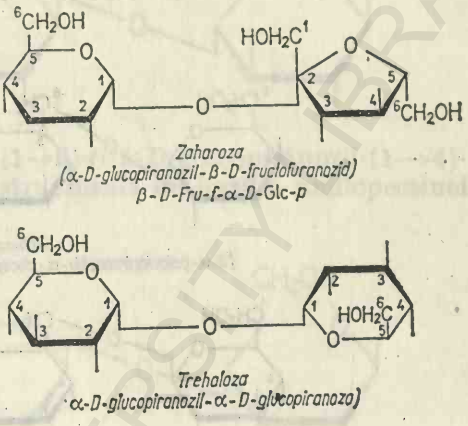


Fig. 9.8. — Formulele structurale ale diozelor nereducătoare. *Zaharoza* este dioza cea mai comună și mai folosită în alimentația omului și în diferite ramuri ale economiei; este larg răspîndită în lumea vegetală, găsindu-se în cantități variabile în frunze, fructe, semințe, flori, rădăcini, în sfecla de zahăr (14 — 20 %), în sucul tulpinelor de trestie de zahăr (11—15 %). Din ultimele două surse vegetale se extrage pe cale industrială. Legătura glicozidică în zaharoză este de tipul α,β-1→2. Sub acțiunea β-fructofuranozidazei zaharoza este hidrolizată cu formare de glucoză și fructoză, proces însoțit de modificarea rotației planului luminii polarizate, din pozitiv (dextro) în negativ (levo) și denumit și invertirea zaharozei. Amestecul echimolecular de glucoză și fructoză este denumit „zahăr invertit" și se găsește în miere. *Trehaloza* este o dioză dicarbonilică nereducătoare prezentă în lipidele bacilului tuberculos, în alge, cornul secarei și la unele plante superioare.

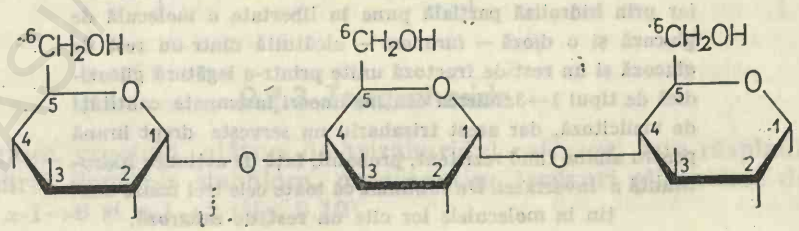
Trehaloza este un dizaharid întîlnit în mici cantități în lumea vegetală îndeosebi, în ciupercile tinere, în sporii și corpurile de fructificare ale unor ciuperci microscopice, în drojdii și în unele alge. La insecte acest dizaharid se găsește în cantități mai mari și pare să îndeplinească rolul pe care-l joacă glucoza la mamifere (K a l f și R i e d e r, 1958), întîlnindu-se, în ouăle, larvele și pupele de insecte, unde formează peste 10% din masa uscată a acestora (D u t r i e u, 1961).

Cantități însemnate de trehaloză pot fi preparate din *Selaginella lepidophylla* și din diferite tulpini de drojdii.

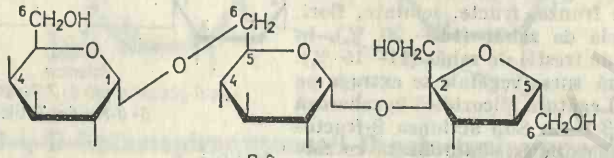
9.2.2 Trizaharide

Trizaharidele sînt alcătuite din trei resturi de monoze, unite între ele prin legături glicozidice de tipul 1→4, 1→6 și 1→3. Dintre trizaharide fac parte rafinoza, genția noza și melicitoza (fig. 9.9).

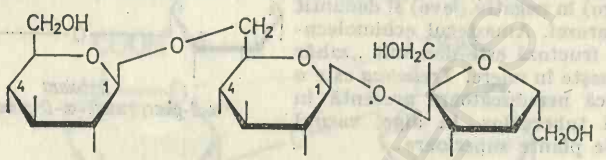
Maltotrioza este trizaharidul cel mai important din punct de vedere biochimic și ea reprezintă o *O*-α-*D*-glucopiranozil-(1→4)-*O*-α-*D*-glucopiranozil-(1→4)-α-*D*-glucopiranoza:



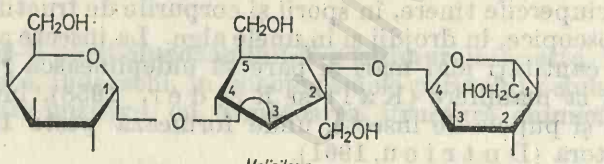
trizaharid reducător care se întîlnește ca unitate structurală a glicogenului și amidonului, și uneori se acumulează în mici cantități în unele țesuturi, probabil, ca urmare a acțiunii hidrolizante a amilazei asupra glicogenului. Amilaza salivară acționînd asupra amilozei eliberează, de asemenea, maltotrioză, alături de maltoză și maltotetroză.



Rafinoza
(6-α-galactopiranozido-α-glucopiranozido-β-fructofuranozid)



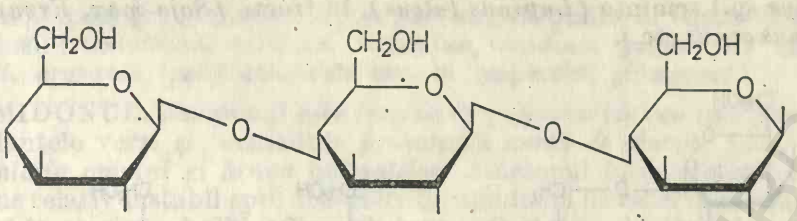
Gențianoza
[6-(β-glucopiranozido)-α-glucopiranozido-β-fructofuranozid]



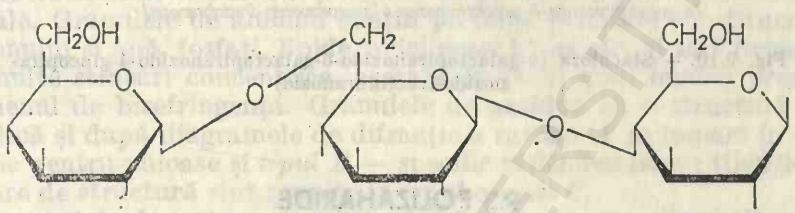
Melicitoza
[3-(α-glucopiranozido)-β-fructofuranozido-α-glucopiranozid)]

Fig. 9.9. — Formulele structurale ale triozelor nereducătoare. ***Rafinoza*** **sau** ***melitrioza*** **este o trioză alcătuită din resturile de glucoză, fructoză și galactoză și sub acțiunea α-galactozidazei este hidrolizată cu formare de D-galactoză și zaharoză.** ***Gențianoza*** **a fost izolată din rizomii de** ***Gențiana*** **unde pare să fie depusă sub formă de rezervă și prin hidroliză acidă se scindează în gențiobioză și fructoză, iar prin hidroliză totală rezultă două molecule de glucoză și o moleculă de fructoză.** ***Melicitoza,*** **trioză mai puțin răspîndită care prin hidroliză dă naștere la două molecule de glucoză și o moleculă de fructoză, iar prin hidroliză parțială pune în libertate o moleculă de glucoză și o dioză — *turanoza* — alcătuită dintr-un rest de glucoză și un rest de fructoză unite printr-o legătură glicozidică de tipul 1→3. Mierea conține uneori însemnate cantități de melicitoză, dar acest trizaharid nu servește drept hrană pentru albine fiind rezistent, probabil, față de acțiunea hidrolizantă a invertazei. De subliniat că toate cele trei trioze conțin în moleculele lor cîte un rest de zaharoză.**

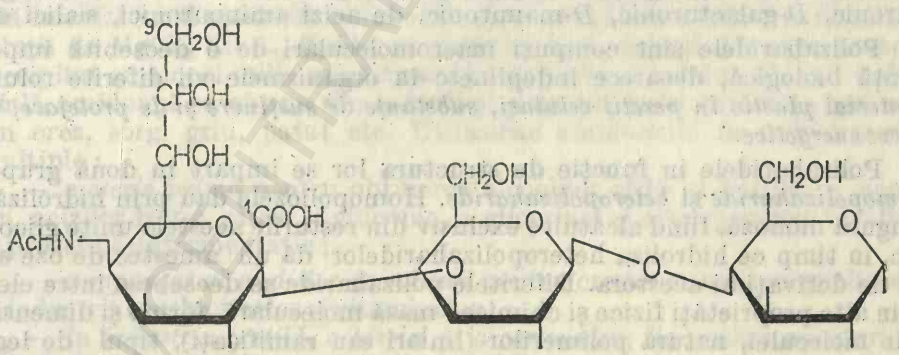
Celotrioza sau *O*-β-*D*-glucopiranozil-(1→4)-*O*-β-*D*-glucopiranozil-(1→)4-β-*D*-glucopiranoza, constituie unitatea structurală a celulozei :



Panoza sau *O*-α-*D*-glucopiranozil-(1→6)-*O*-α-*D*-glucopiranozil-(1-→4)-*D*-glucopiranoza, care este unitatea structurală de bază a amilopectinei și glicogenului :



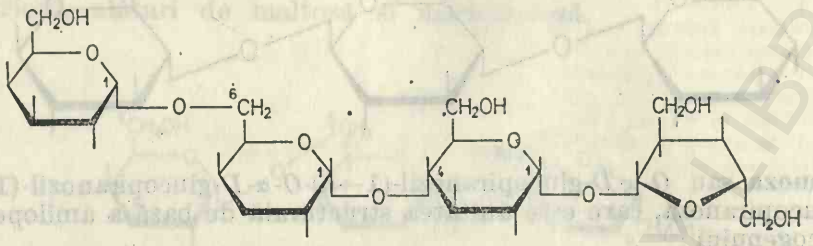
Neuramin-lactoza — sau *O*-(*N*-Acetil neuraminil)-(2→3)-*O*-β-*D*-galactopiranozil-(1→4)-*D*-glucopiranoza este unicul trizaharid care conține acid neuraminic și a fost izolat din glanda mamară de șobolan (T r u c c o și C a p u t t o, 1954) și ulterior din *colostrum*. Se presupune că acest trizaharid îndeplinește un rol important în structura glicoproteidelor, unde formează, probabil, partea terminală a componentei glucidice a acestora, condiționînd reacția imunologică a grupării determinante a antigenului. Structura neuraminlactozei este următoarea :



9.2.3 Tetrazaharide

În lumea vegetală, alături de trizaharidul *rafinoza*, este răspîndit un tetrazaharid denumit stachioza, care conține legături glicozidice de tip α-1→4, α-1→6 și α-1→2 (fig. 9.10).

Stachioza este un tetrazaharid nereducător, parțial fermentat de drojdii și a fost izolat din diferite specii vegetale unde este răspîndit în rădăcini *(Stachys* sp.) semințe *(Lupinus luteus)*, în fructe *(Soja max, Ervum lens, Fraxinus ornus* etc.).



Stahioza
(α-galactopiranozido-6-galactopiranozido-4-glucopiranozido-fructofuranozid)

Fig. 9.10. — Stachioza (α-galactopiranozido-6-galactopiranozido-4-glucopiranozido-fructofuranozid)

9.3 POLIZAHARIDE

Cea mai mare parte a ozelor naturale există în natură sub formă de *compuși macromoleculari*, cu masă moleculară mare, denumiți *polizaharide* sau *polioze*, care *prin hidroliză dau exclusiv sau în primul rînd monoze sau produși înrudiți acestora.* Polizaharidele conțin de la cîteva zeci pînă la cîteva mii de resturi de monoze, cel mai frecvent, glucoză. În structura lor au fost întîlnite și resturi de *D*-manoză, *L*-galactoză, *D*-xiloză, *L*-arabinoză, *D*-fructoză, *D*-glucozamină, *D*-galactozamină, resturi de acizi *D*-glucuronic, *D*-galacturonic, *D*-manuronic, de acizi aminouronici, sialici etc.

Polizaharidele sînt compuși macromoleculari de o deosebită importanță biologică, deoarece îndeplinesc în organismele vii diferite roluri: *material plastic în pereții celulari, substanțe de susținere și de protejare, rezerve energetice.*

Polizaharidele în funcție de structura lor se împart în două grupe: *homopolizaharide* și *heteropolizaharide.* Homopoliozele dau prin hidroliză o singură monoză, fiind alcătuite exclusiv din resturile acesteia unite glicozidic, în timp ce hidroliza heteropolizaharidelor dă un amestec de oze sau /și de derivați ai acestora. Diferitele polizaharide se deosebesc între ele și prin alte proprietăți fizice și chimice: masă moleculară, forma și dimensiunile moleculei, natura polimerilor (liniari sau ramificați), tipul de legături glicozidice, natura și numărul unităților structurale de bază care se repetă, solubilitatea în apă și în alți solvenți, proprietăți chimice (reacții de culoare, reacții specifice cu diferiți reactivi chimici sau soluții etc.).

Polizaharidele se găsesc în celulă sub formă solubilă ceea ce permite acumularea lor în cantități mari fără a influența, de exemplu la plante, presiunea osmotică sau alte procese fiziologice.

9.3.1 Homopolizaharide

Din această grupă fac parte compuși larg răspîndit în regnurile vegetal și animal : *amidonul, celuloza, lichenina, inulina, galactanii, mananii, xilanii, arabanii, polifructozidele* etc. și respectiv, *glicogenul.*

AMIDONUL. Amidonul este *rezerva de polizaharide* cea mai însemnată din plantele verzi și constituie *principala sursă de glucide (oze) pentru alimentația omului și hrana animalelor.* Amidonul fotosintetizat este un compus relativ instabil spre deosebire de amidonul de rezervă care se depozitează în semințe, bulbi, tuberculi care este stabil. Amidonul se găsește în cantități apreciabile în porumb (65—75%), grîu (60—70%), cartof (12—20%), orez (60—80%) și în proporții mai mici și în alte plante de cultură. Amidonul este un amestec de polioze depozitate sub formă de granule de mărime, structură și aspect caracteristice pentru diferite specii vegetale. Granulele de amidon conțin pe lîngă poliozele constituente ale amidonului și apă, fosfați, lipide, acizi grași liberi etc. și sînt formate din mai multe straturi concentrice, așezate, în jurul unui nucleu prezentînd fenomenul de birefringență. Granulele de amidon au o structură microcristalină și după diagramele de difracție a razelor X se împart în *tipul A* specific pentru păioase și *tipul B* — specific rădăcinoaselor ; tipurile intermediare de structură sînt reunite în *tipul comun C.*

Preparatele de amidon se prezintă sub forma unei pulberi albe, insolubilă în apă rece, în alcool și eter ; prin încălzire se înmoaie în apă formînd cleiul de amidon.

Temperatura de obținere a cleiului de amidon variază în funcție de sursa de amidon (cartof 55 — 65°, porumb 64 — 71°C, grîu 60—80°C, orez 70—80°C etc.).

Soluțiile diluate apoase ale amidonului sînt optic active și cu iodul dau o colorație albastră intensă *.

Amidonul este o substanță cu slabe proprietăți reducătoare, ușor solubilă în acizi (acid clorhidric, tricloracetic și acid sulfosalicilic) în alcalii, în soluții de $MgCl_2$, $CaCl_2$, $ZnCl_2$, în glicerină etc., soluții din care poate fi precipitat cu alcool etilic sub formă de complecși ai iodului. Pe cale industrială amidonul se obține din cartofi și porumb, și în cantități mai mici din orez, sorg, grîu, patat etc. Utilizările amidonului în industrie sînt multiple :

— *materie primă* pentru obținerea alcoolilor etilic și butilic, a acetonei, acizilor lactic, citric și gluconic, a glicerinei și altor produse rezultate în procesele de fermentație ;

— *component al mediilor de cultură* pentru creșterea microorganismelor în industria antibioticelor și vitaminelor ;

— *în industria textilă, a hîrtiei și a cartonului,* fie pentru apreturi, fie sub formă de clei de amidon ;

---

* Amidonul solubil utilizat în laborator ca reactiv chimic este un produs de hidroliză al *amidonului nativ,* care este mai solubil decît acesta. Amiloza și amilopectina dau cu soluțiile de iod colorații diferite, albastru intens și respectiv roșu-violet, cu maxime de absorbție deosebite (620—650 nm și 520—580 nm).

— *în chimie și biochimie* ca reactiv chimic ;

— *în alimentația omului și în hrana animalelor domestice* amidonul, alături de glicogen, constituie una din principalele surse de glucide.

Din punct de vedere chimic amidonul este un amestec de două homopolizaharide cu mase moleculare și structură chimică diferită : *amiloza* și *amilopectina*. Raportul dintre amiloză și amilopectină variază la diferite specii vegetale, dar în medie raportul este de 1/3, amilopectina formînd 75%, iar amiloza 25% din moleculă. Unele soiuri de porumb galben, de orez și de hamei conțin amidon alcătuit aproape numai din amilopectină, în timp ce amidonul din alte soiuri de porumb, mazăre, precum și unele specii de liliacee conțin pînă la 50—75% amiloză. Raportul amiloză/amilopectină pentru amidonul de diferite proveniențe variază și în funcție de condițiile de selecție, cultură și de perioada de vegetație a plantelor.

Amiloza este o poliozâ liniară sau extrem de puțin ramificată, alcătuită din 200 pînă la 1 000 de resturi de α-*D*-glucopiranoză unite între ele prin legături glicozidice de tipul α-1,4 în lanțul liniar și α-1,6, în punctele de ramificare. În amiloză se mai întîlnesc un număr redus de legături glicozidice β-1,2 ; β-1,3 ; și β-1,4 (v. fig. 9.11). Analiza roentgenostructurală a amilozei

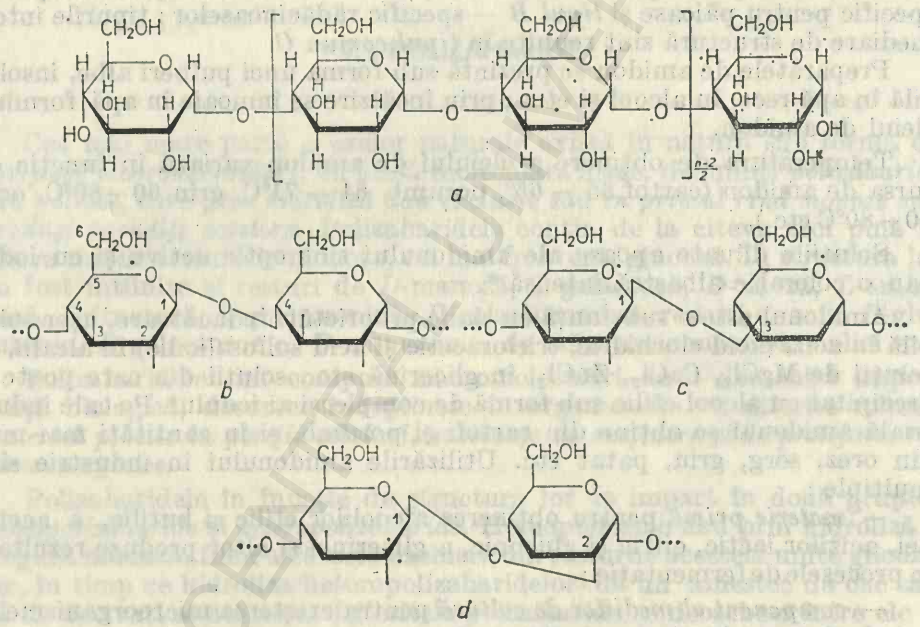


Fig. 9.11. — Structura moleculei de amiloză (*a*) și diferite tipuri de legături glicozidice întîlnite în aceasta (*b—d*) ; *b*) legătura glicozid β 1→4 ; *c*) legătura glicozid β 1→3 ; *d*) legătura glicozid β 1→2.

a arătat că molecula ei nu este alcătuită dintr-o catenă liniară simplă ci formează spirale, fiecare spiră cuprinzînd șase resturi glicozil. Interiorul helicoidal al spiralei are un diametru de aproximativ 5Å și în el pot pătrunde moleculele mai mici ale altor substanțe, de exemplu iodul, formînd *combinații de incluziune*. Masa moleculară a amilozei variază între 32 000

și 100 000. Cu fenolii, piridina, acizii grași, cu alcoolul butilic și alcoolu amilic amiloza formează complecși cristalini insolubili. Amiloza este degradată enzimatic de către β-amilază *(1,4-glucanmaltohidrolază)* cu formare de maltoză.

Amilopectina este cea de a doua polioză constitutivă a amidonului, puternic ramificată, alcătuită din 600 — 6 000 de resturi de α-*D*-glucopi-

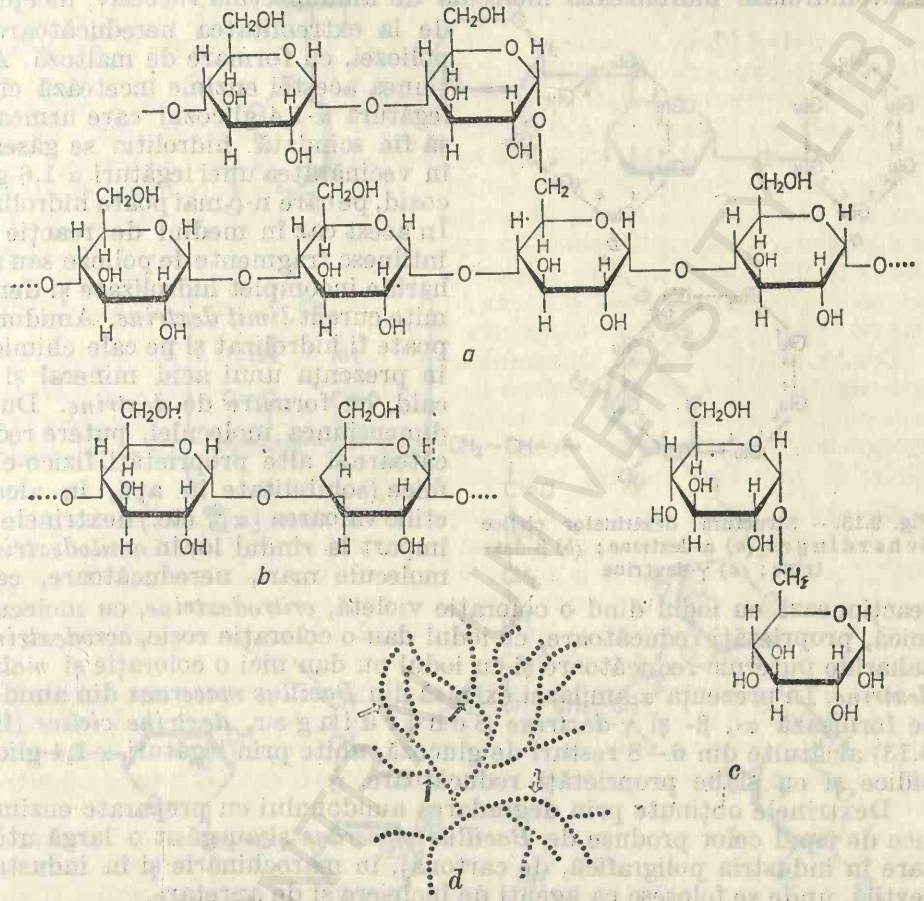


Fig. 9.12. — Structura macromoleculei de amilopectină (*a*) și tipul de legătură α 1→3 glicozid întîlnit mai rar în această polioză. Dovada prezenței legăturilor glicozid α-1,6 în amilopectină o constituie faptul că din hidrolizatul acid al acesteia a fost izolată β-*D*-glucopiranozilglucopiranoza sau izomaltoza (*c*) Schema structurii parțiale unei molecule de amilopectină (*d*) legături α-1,4-glicozid ⇒ ; legături α-1,6-glicozid →.

ranoză unite între cele prin legături α-1,4 și α-1,6-glicozidice ; conține, de asemenea, și un număr relativ mic de legături glicozidice de tipul α-1,3. Punctele de ramificare ale catenei polizice se repetă după 25—30 de resturi glicozil și se caracterizează prin formarea legăturilor α-1,6-glicozidice (fig. 9.12). Masa moleculară a amilopectinei este de 100 000 pînă la 1 000 000 de daltoni, catenele acestei macromolecule „arborescente" conferind macromoleculelor o orientare tridimensională.

Produsele de degradare a amidonului sînt în cazul amilozei şi al acţiunii α-1,4-glucan-4-glucanohidrolazei un amestec de glucoză şi maltoză, iar sub acţiunea α-1,4-glucanmaltohidrolazei numai molecule de maltoză; amilopectina este hidrolizată de α-1,4-glucan-4-glucanohidrolază cu formare de zaharide neramificate şi ramificate de diferite dimensiuni şi caracterizate prin prezenţa a numeroase legături α-1,6-glicozid. α-1,4-glucan maltohidrolaza hidrolizează molecula de amilopectină succesiv, începînd de la extremitatea nereducătoare a poliozei, cu formare de maltoză. Acţiunea acestei enzime încetează cînd legătura α-1,4-glicozid care urmează să fie scindată hidrolitic se găseşte în vecinătatea unei legături α-1,6-glicozid, pe care n-o mai poate hidroliza. În acest caz în mediul de reacţie se întîlnesc fragmente de polioze sau zaharide incomplet hidrolizate şi denumite curent *limit dextrine*. Amidonul poate fi hidrolizat şi pe cale chimică, în prezenţa unui acid mineral şi la cald, cu formare de *dextrine*. După dimensiunea moleculei, putere reducătoare şi alte proprietăţi fizico-chimice (solubilitate în apă, în alcool etilic valoarea $[\alpha]_D^{20}$ etc.) dextrinele se împart la rîndul lor în *amilodextrine*, molecule mari, nereducătoare, care reacţionează cu iodul dînd o coloraţie violetă, *eritrodextrine*, cu moleculă mică, proprietăţi reducătoare, cu iodul dau o coloraţie roşie, *acrodextrine*, zaharide puternic reducătoare şi cu iodul nu dau nici o coloraţie şi *maltodextrine*. În prezenţa α-amilazei extrasă din *Bacillus macerans* din amidon se formează α-, β- şi γ-*dextrine* Schardinger, *dextrine ciclice* (fig. 9.13) alcătuite din 6—8 resturi de glucoză, unite prin legături α-1,4-glicozidice şi cu slabe proprietăţi reducătoare.

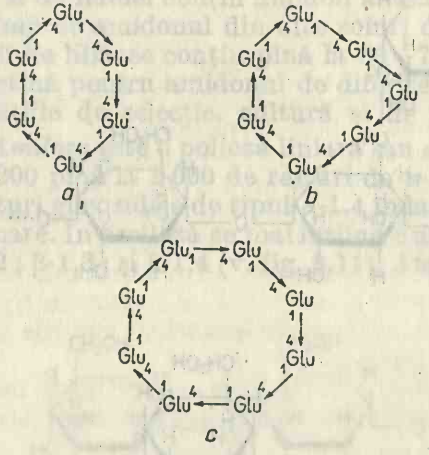
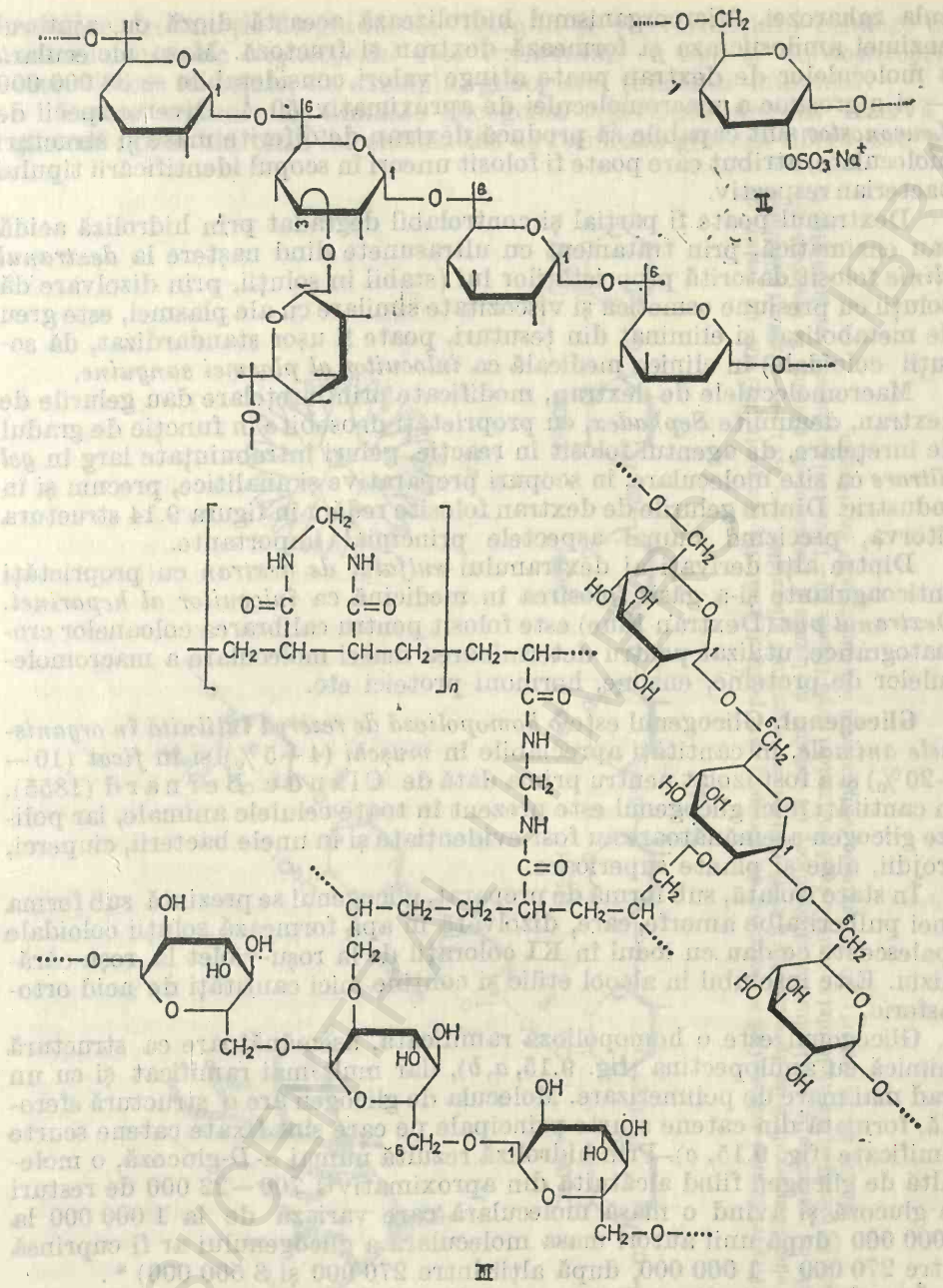


Fig. 9.13. — Structura dextrinelor ciclice Schardinger (*a*) α-dextrine; (*b*) β-dextrine; (*c*) γ-dextrine

Dextrinele obţinute prin degradarea amidonului cu preparate enzimatice de tipul celor produse de *Bacillus macerans* şi-au găsit o largă utilizare în industria poligrafică, de cartonaj, în marochinărie şi în industria textilă, unde se folosesc ca agenţi de încleiere şi de apretare.

Dextranii *sînt polioze de origine microbiană*, cu o structură liniară sau arborescentă — ramificată — alcătuite din resturi de α-*D*-glucopiranoză unite între ele prin legături α-1,4- şi α-1,6-glicozidice. Resturile glicozil din structura liniară sînt unite prin legături α-1,6-glucozidice, dar în unele preparate de dextran în punctele de ramificare se întîlnesc legături α-1,4-; α-1,3- şi α-1,2-glucozidice (fig. 9.14). Sînt compuşi optic activi, deviind puternic planul luminii polarizate spre dreapta — $[\alpha]_D = +199°$ şi $+255°$ — de unde le vine şi denumirea de dextrani. Microorganismul *Leuconostoc mesenteroides*, cultivat pe medii de zaharoză este capabil să producă o mare cantitate de dextran pe care o elimină în mediu sub formă de filamente, utilizînd în acest scop numai resturile de α-glucopiranoză din mole-



II

III

Fig. 9.14. — Structura dextranului şi a derivaţilor săi de sinteză. Structura parţială a dextranului din *Leuconostoc mesenteroides B 512* (I). 95 % legături α-1→6 în catena principală şi în catenele laterale. Catenele laterale sînt legate de catena principală prin legături α-1→3 şi au în structura lor mai mult decît o singură unitate de glucoză. Structura parţială a dextran sulfatului (II), derivat polianionic, obţinut prin esterificarea dextranului cu acid clorosulfonic. Conţinutul sulfului este de aproximativ 17 % ceea ce corespunde la circa 2,3 grupări sulfat la un rest de glucoză. Sephacril (III) — legături covalente încrucişate obţinute prin tratarea alil-dextranului cu N,N'-metilenbisacrilamidă; gel rigid cu structura ipotetică menţionată în III, folosit ca mediu de filtrare, în scopuri analitice şi preparative, stabil în solvenţi la *p*H 3 — 11, se foloseşte pentru separarea biopolimerilor. Unele preparate de dextran pot fi marcate cu substanţe fluorescente, de exemplu cu fluoresceln izotiocianat (FITC-Dextran) şi sînt utilizate în studiile care necesită perfuzia organelor animale. Masa moleculară a unor asemenea preparate variază între 3 000 şi 150 000 daltoni.

cula zaharozei. Microorganismul hidrolizează această dioză cu ajutorul enzimei amilosucraza şi formează dextran şi fructoză. Masa moleculară a moleculelor de dextran poate atinge valori considerabile — 38 000 000 — şi o grosime a macromoleculei de aproximativ 50 Å. Diverse specii de *Leuconostoc* sînt capabile să producă dextran de diferite mase şi structuri moleculare, atribut care poate fi folosit uneori în scopul identificării tipului bacterian respectiv.

Dextranul poate fi parţial şi controlabil degradat prin hidroliză acidă sau enzimatică, prin tratament cu ultrasunete dînd naştere la *dextranul clinic* folosit datorită proprietăţilor lui (stabil în soluţii, prin dizolvare dă soluţii cu presiune osmotică şi vîscozitate similare cu ale plasmei, este greu de metabolizat şi eliminat din ţesuturi, poate fi uşor standardizat, dă soluţii coloidale) în clinica medicală ca *înlocuitor al plasmei sanguine*.

Macromoleculele de dextran, modificate prin înreţelare dau gelurile de dextran, denumite *Sephadex*, cu proprietăţi deosebite în funcţie de gradul de înreţelare, de agentul folosit în reacţie, geluri întrebuinţate larg în *gel filtrare* ca site moleculare, în scopuri preparative şi analitice, precum şi în industrie. Dintre gelurile de dextran folosite redăm în figura 9.14 structura cîtorva, precizînd numai aspectele principial importante.

Dintre alţi derivaţi ai dextranului *sulfatul de dextran* cu proprietăţi anticoagulante şi-a găsit folosirea în medicină ca *înlocuitor al heparinei*. *Dextranul pur* (Dextran Blue) este folosit pentru calibrarea coloanelor cromatografice, utilizat pentru determinarea masei moleculare a macromoleculelor de proteine, enzime, hormoni proteici etc.

Glicogenul. Glicogenul este *o homopolioză de rezervă întîlnită în organismele animale*, în cantităţi apreciabile în *muşchi* (4—5%) şi în *ficat* (10—20%) şi a fost izolat pentru prima dată de Claude Bernard (1855). În cantităţi mici glicogenul este prezent în toate celulele animale, iar polioze glicogen-asemănătoare au fost evidenţiate şi în unele bacterii, ciuperci, drojdii, alge şi plante superioare.

În stare izolată, sub formă de preparat, glicogenul se prezintă sub forma unei pulberi albe amorfe, care, dizolvată în apă formează soluţii coloidale opalescente ce dau cu iodul în KI coloraţii de la roşu-violet la roşu-cărămiziu. Este insolubil în alcool etilic şi conţine mici cantităţi de acid ortofosforic.

Glicogenul este o homopolioză ramificată, asemănătoare ca structură chimică cu amilopectina (fig. 9.15, *a*, *b*), dar mult mai ramificat şi cu un grad mai mare de polimerizare. Molecula de glicogen are o structură sferoidă, formată din catene scurte principale pe care sînt fixate catene scurte ramificate (fig. 9.15, *c*). Prin hidroliză rezultă numai α-*D*-glucoză, o moleculă de glicogen fiind alcătuită din aproximativ 1 700—22 000 de resturi de glucoză şi avînd o masă moleculară care variază de la 1 000 000 la 4 000 000 (după unii autori masa moleculară a glicogenului ar fi cuprinsă între 270 000 — 1 000 000, după alţii între 270 000 şi 3 500 000) *.

În celulele vii glicogenul se prezintă sub forma unor particule mici, care pot fi evidenţiate histologic în compoziţia diferitelor infrastructuri

* Variaţia în limite atît de largi a masei moleculare a glicogenului se explică, probabil, prin faptul că se folosesc preparate de glicogen de diferite proveniente şi metode diverse de analiză.

celulare. În funcție de gradul de fixare în aceste formațiuni celulare unii autori deosebesc *lioglicogenul* ușor extractabil cu apă și *desmoglicogenul* intens fixat în celule, de exemplu, glicogenul țesutului muscular.

Pentru organismele animale glicogenul reprezintă singura rezervă de glucoză; prin hidroliza lui enzimatică se formează glucoza liberă sau glu-

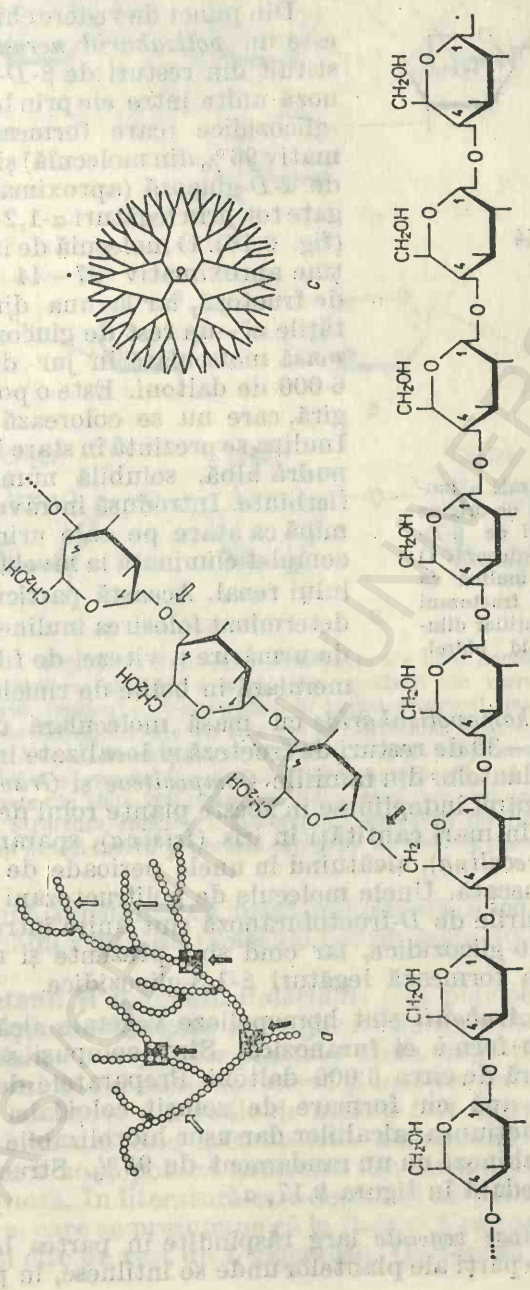


Fig. 9.15. — (*a*) Reprezentarea schematică a moleculei de glicogen, care poate fi alcătuită din peste 120 000 de resturi de glucoză și atinge o masă moleculară de aproximativ 2×10^8 daltoni; ⇒— legături glicozidice $\alpha - 1,4$; ➡— legături glicozidice $\alpha - 1,6$ la punctele de ramificație ale lanțurilor oligozidice; (*b*) modul de legare a resturilor de glucoză în molecula glicogenului, punctele de ramificație a moleculei se repetă după unii autori după fiecare 10—18 resturi de glucoză, iar după alții la fiecare 8—10 resturi; (*c*) agregate de formă sferică ale moleculelor de glicogen.

BCU IASI UNIVERSITY LIBRARY

cozo-1-fosfat, iar excesul de glucoză din fluxul sanguin portal survenit după digestia hranei se depune în ficat sub formă de glicogen de rezervă.

Inulina este o homopolioză vegetală de rezervă răspîndită îndeosebi în rădăcinile de păpădie, cicoare, cog-sacîz, în rădăcinile, frunzele și tulpinile de *Parthenium argentatum*, în tuberculii de napi, dalie și în alte plante. Organismele animale și omul asimilează ușor inulina.

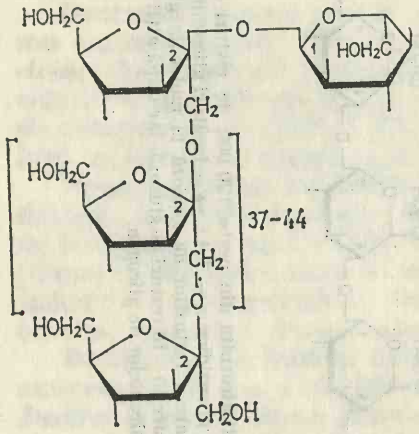


Fig. 9.16. — Formula structurală a inulinei, homopolioză de rezervă de origine vegetală alcătuită din resturi de β-*D*-fructoză și un rest de α-*D*-glucoză. O particularitate a moleculei de inulină ca de altfel și a moleculelor de fructozani este faptul că în prezența soluțiilor diluate de acizi minerali sînt rapid hidrolizate.

Din punct de vedere chimic inulina este un *polizaharid neramificat* constituit din resturi de β-*D*-fructofuranoză unite între ele prin legături 1,2-glicozidice (care formează aproximativ 96% din moleculă) și din resturi de α-*D*-glucoză (aproximativ 4%) legate tot prin legături α-1,2-glicozidice (fig. 9.16). O moleculă de inulină conține aproximativ 37—44 de resturi de fructoză, iar la una din extremitățile ei—un rest de glucoză, avînd o masă moleculară în jur de 5 000 — 6 000 de daltoni. Este o polioză levogiră, care nu se colorează cu iodul. Inulina se prezintă în stare izolată ca o pudră albă, solubilă numai în apă fierbinte. Introdusă intravenos se elimină ca atare pe cale urinară, fiind complet eliminată la nivelul glomerulului renal. Această particularitate a determinat folosirea inulinei în testele de urmărire a vitezei de filtrare glomerulară în bolile de rinichi.

Polifructozanii sînt *homopolizaharide* cu masă moleculară mică alcătuite din aproximativ 3—30 de resturi de fructoză și localizate în frunzele, tulpinile și semințele plantelor din famiiile *Compositeae* și *Gramineae*. Se presupune că polifructozanii îndeplinesc în aceste plante rolul de *substanțe de rezervă*. Ei se găsesc în mari cantități în iris (*irisina*), sparanghel (*asparagozina*), în secară (*secalina*), alcătuind în unele perioade de vegetație pînă la 30% din masa uscată. Unele molecule de polifructozani conțin și resturi de glucoză; resturile de *D*-fructofuranoză sînt unite între ele prin legături β-2,1 — și β-2,6-glicozidice, iar cînd sînt prezente și resturi de *D*-glucopiranoză acestea formează legături β-1,3-glicozidice.

Arabanii și xilanii. *Arabanii* sînt homopolioze vegetale alcătuite din resturi *L*-arabinoză sub forma ei furanozică. Sînt compuși solubili în apă cu o masă moleculară de circa 6 000 daltoni. Preparatele de arabani sînt amorfe, solubile în apă cu formare de soluții coloidale, puternic levogire, rezistente la acțiunea alcaliilor dar ușor hidrolizabile în mediu acid cînd se formează arabinoză cu un randament de 95%. Structura chimică a arabanilor este redată în figura 9.17, *a*.

Xilanii sînt *homopolioze vegetale* larg răspîndite în partea lemnoasă, în tulpini, ramuri și alte părți ale plantelor unde se întîlnesc, în principal,

în structura pereților celulari. Împreună cu arabanii și galactanii se întîlnesc *în substanțele pectice.* În paie și în partea lemnoasă a foioaselor xilanii reprezintă circa 25%, iar la conifere 12%. Din punct de vedere chimic sînt alcătuiți din resturi de β-*D*-xiloză (fig. 9.17, *a*, *b*) și în unele cazuri conțin și mici cantități de arabinoză, situate de obicei la extremitatea lanțului.

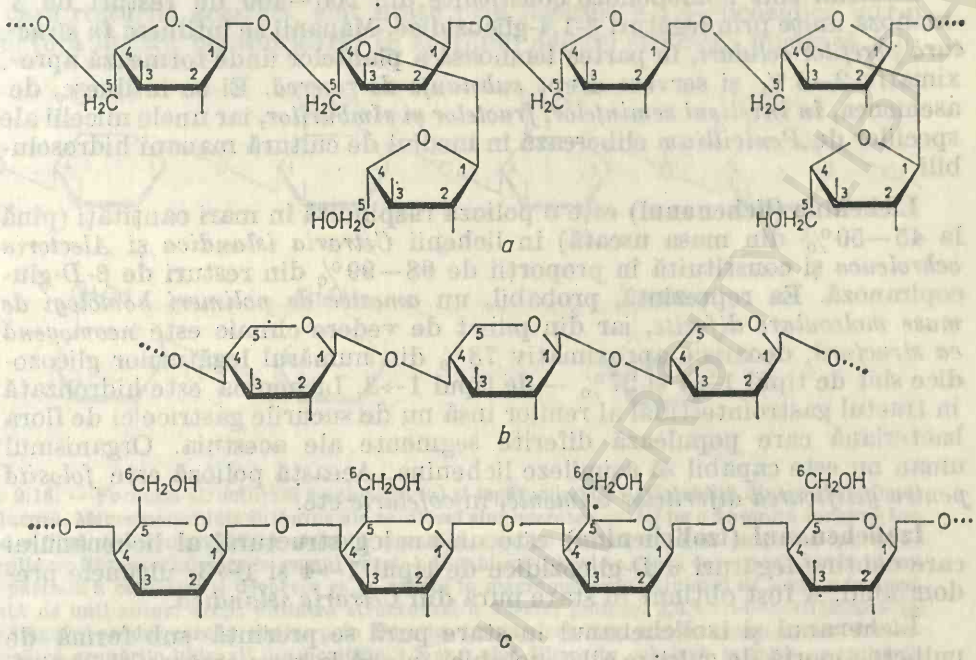


Fig. 9.17. Formulele structurale ale unor homopolioze vegetale.
(*a*) Structura chimică a *arabanilor*, alcătuiți din resturile pentozei arabinoza, unite între ele prin legături 1,5-glicozidice în lanțul principal molecula prezintă la fiecare al doilea rest de arabinoză cîte un rest tot de arabinoză legat de lanț printr-o legătură 1,3-glicozidică. (*b*) *Xilanii* sînt alcătuiți din resturi de β-*D*-xilopiranoză unite între ele prin legături β-1,4-glicozidice și prezintă o catenă lineară ramificată. (*c*) *Galactanii* sînt homopoliozide lineare formate din 100—200 resturi de β-galactoză (hexoză) unite între ele prin legături β-1,4-glicozidice. Structura chimică a galactanilor este încă insuficient de bine studiată din care cauză diferiți autori includ în această categorie de polioze și compuși cu alte tipuri de legături glicozidice.

Xilanii sînt substanțe cu masă moleculară mică, gradul de polimerizare fiind variabil : diferite molecule conțin între 40 și 200 resturi de *D*-xilopiranoză.

Galactanii și mananii. *Galactanii* sînt polioze alcătuite din resturi de *D*-galactopiranoză legate β-1,4-glicozidic (fig. 9.17,*c*) și sînt răspîndiți *în pereții celulari ai organelor plantelor* unde, după toate probabilitățile, îndeplinesc rolul de *substanțe de rezervă* și însoțesc substanțele pectice. Din plămînii de bovine și din ouăle de melc a fost extras un galactan „animal" a cărui structură este necunoscută. Galactanul extras din semințele de lupin este o homopolioză alcătuită din circa 100—120 resturi de β-*D*-galactopiranoză. În literatură este descris și un polimer al galactozei denumit *galactogen*, care se presupune că la fiecare 6 resturi de β-*D*-galactopiranoză conține și cîte un rest de *L*-galactoză. Galactanii extrași din algele marine

conţin resturi de *D*-galactopiranoză unite, probabil, prin legături β-1,3--glicozidice, precum şi hidroxil esterificat cu un rest de acid sulfuric. Din *Penicillium Charlesii* a fost izolată *galactocaroloza*, alcătuită din 9—10 resturi de β-*D*-galactofuranoză unite prin legături β-1,5-glicozidice.

Mananii sînt homopolioze constituite din 200—400 de resturi de β -manoză unite prin legături β-1,4-glicozidice. Mananii se întîlnesc *în structura pereţilor celulari*, în partea lemnoasă a plantelor unde formează aproximativ 2—7% şi servesc drept *substanţe de rezervă*. Ei se întîlnesc, de asemenea, *în învelişul seminţelor, fructelor şi sîmburilor*, iar unele micelii ale speciilor de *Penicillium* eliberează în mediul de cultură manani hidrosolubili.

Lichenina (lichenanul) este o polioză răspîndită în mari cantităţi (pînă la 45—50% din masa uscată) în lichenii *Cetraria islandica* şi *Alectoria ochroleuca* şi constituită în proporţii de 98—99% din resturi de β-*D*-glucopiranoză. Ea reprezintă, probabil, un *amestec de polimeri homologi de mase moleculare diferite*, iar din punct de vedere chimic este *neomogenă ca structură*, deoarece aproximativ 73% din numărul legăturilor glicozodice sînt de tipul 1→4 şi 27% — de tipul 1→3. Lichenina este hidrolizată în tractul gastrointestinal al renilor însă nu de sucurile gastrice ci de flora bacteriană care populează diferite segmente ale acestuia. Organismul uman nu este capabil să asimileze lichenina. Această polioză este *folosită pentru gelificarea diferitelor alimente*, în *cofetărie* etc.

Izolichenanul (izolichenina) este un analog structural al lichenanului care conţine legături α-*D*-glicozidice de tipul 1→4 şi 1→3, ultimele predominînd. A fost obţinut în stare pură din *Cetraria islandica*.

Lichenanul şi izolichenanul în stare pură se prezintă sub formă de pulbere amorfă de culoare albă, solubilă în apă la temperatura obişnuită.

Chitina este un *polizaharid răspîndit la fungi, algele verzi, algele roşii, diatomee, artropode, anelide, moluşte* etc. şi reprezintă din punct de vedere chimic un polimer liniar alcătuit din resturi β-*D*-2-acetamido-2-deoxi-*D*--glucopiranozice unite între ele prin legături glicozidice 1→4. Chitina este mai puţin reactivă decît celuloza din cauza insolubilităţii ei în apă, solvenţi organici, reactiv cuproamoniacal; este parţial solubilă în acizi minerali concentraţi, în soluţii apoase concentrate ale sărurilor de litiu şi calciu.

Chitina prezentă în cuticula animalelor este asociată în proporţii diferite cu săruri anorganice, de cele mai multe ori cu carbonat de calciu, cu diferite molecule de proteine ş.a.

Celuloza. *Celuloza* este *homopolioza cea mai răspîndită în regnul vegetal* unde formează mai mult de 50% din compuşii carbonului, fiind *cea mai răspîndită substanţă organică de pe planeta noastră*. În fiecare an plantele sintetizează aproximativ 10^{11}t de celuloză. Principalele surse pentru obţinerea celulozei sînt *fibrele de bumbac* care conţin celuloză liberă şi aproape pură în proporţie de 99,8%, *fibrele de in, cînepă, iută, papirus, bambus* etc. Prezenţa celulozei a fost evidenţiată în cantităţi variabile între 0,5—12% din greutatea uscată, şi la algele verzi, brune şi roşii. În plante, celuloza este asociată cu alte substanţe: *lignina, pectina, hemiceluloza*, diferite *răşini, lipide, glicozide, taninuri* etc. care pot fi îndepărtate în procesul de

purificare al celulozei prin tratarea acesteia cu amestecuri de sodiu și sulfat de sodiu. Celuloza pură se prezintă sub forma unei substanțe albe cu o structură fibrilară, cu o greutate specifică de 1,5 și o masă moleculară care variază de la cîteva sute de mii la cîteva milioane de daltoni.

Din punct de vedere chimic celuloza este un polimer al β-*D*-glucozei, în care resturile acesteia, sînt unite prin legături β-1,4-glicozidice într-o structură liniară neramificată. În sprijinul acestei structuri pledează fap-

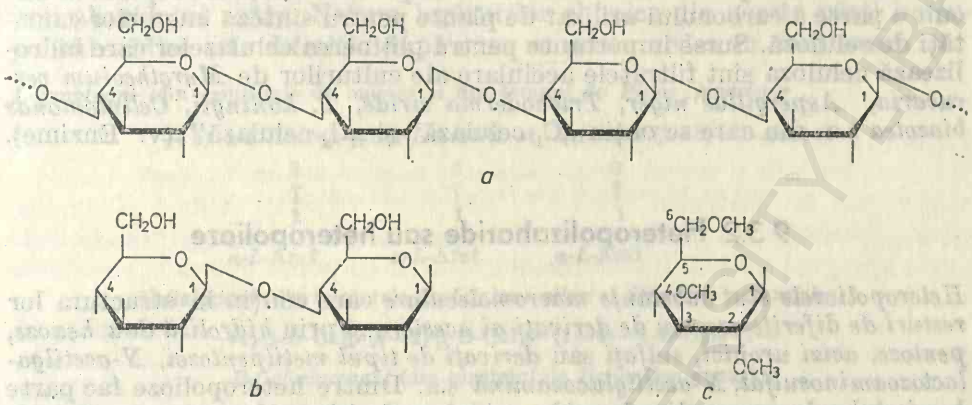


Fig. 9.18. — Formula structurală a celulozei (a) și legăturile β-1,4-glicozidice dintre resturile de *D*-glucoză. Macromoleculele filiforme ale celulozei sînt așezate paralel pe o anumită lungime formînd o fibră de o remarcabilă rezistență mecanică, ceea ce explică rolul de susținere pe care-l îndeplinesc fibrele celulozice în regnul vegetal. Celobioza (b) este o dioză care rezultă prin hidroliza parțială a celulozei și deoarece ea se repetă în macromolecula celulozei de *n* ori este considerată de unii autori drept unitatea structurală a acestei polioze. 2,3,6-tri-O-metilglucoza (c) este singurul produs care se obține prin hidroliza totală a celulozei metilate exhaustiv și demonstrează că grupările hidroxil din pozițiile 2,3 și 6 sînt libere în celuloză în timp ce grupările hidroxil din pozițiile 1 și 4 sînt participante la legătura glicozidică.

tul că prin hidroliză acidă completă (cu HCl conc. sau cu H_2SO_4 conc.) celuloza este hidrolizată cantitativ cu formare de glucoză ; hidroliza parțială sau menajată duce la formare de *celobioză*, iar hidroliza celulozei metilate dă numai 2,3,6-tri-*O*-metilglucoză, ceea ce indică lipsa unor lanțuri laterale. În figura 9.18 sînt prezentate formulele structurale ale acestor substanțe.

Moleculele de celuloză au dimensiuni diferite în funcție de gradul lor de polimerizare, numărul unităților glucopiranozice structurale variind între 2 500 și 15 000. Macromoleculele filiforme ale celulozei conțin legături covalente simple, au un caracter fibros și o structură mixtă cristalină și necristalină confirmată prin analiza cu raze *X*.

Celuloza este o poliozã insolubilă în solvenții obișnuiți, dar solubilă în licoarea S c h w e i t z e r, care este un hidroxid tetraaminocupric. În prezența soluțiilor de NaOH 10% celuloza trece în hidrocelulozã sau celulozã mercerizată. Avînd trei grupări hidroxil libere ea reacționează cu acizii minerali concentrați (H_2SO_4 și HNO_3) trecînd în pergament vegetal sau în nitrocelulozã.

Deoarece animalele superioare și omul nu posedă sisteme enzimatice capabile să hidrolizeze această homopolioză, ea nu prezintă un interes practic pentru hrana lor. Unele organisme animale (melcul, *Mya arenaria*,

anemona de mare, animalele ierbivore ş.a.) precum şi unele ciuperci microscopice şi bacterii pot degrada celuloza utilizînd-o ca sursă de energie sau de atomi de C, deoarece sucurile lor digestive sau flora bacteriană, prezent în tractul lor digestiv sau unele ţesuturi (de exemplu, hepatopancreasul unor nevertebrate) conţin enzima *celulaza* care degradează lemnul, bumbacul şi hîrtia cu punerea în libertate a dizaharidului celobioza. Aceasta la rîndul ei este hidrolizată de celobiaza cu formare de *D*-glucoză, care este asimilată. Acest proces este deosebit de important deoarece repune în circuit o parte a carbonului utilizat de plante pentru sinteza imenselor cantităţi de celuloză. Surse importante pentru obţinerea celulazelor care hidrolizează celuloza sînt filtratele acelulare ale culturilor de *Myrothecium verrucaria, Aspergillus niger, Trichoderma viride, T. koningii, Cellulomonas biazotea* ş.a. din care se obţin „C_1-celulază" şi „C_x-celulază" (v. Enzime).

9.3.2 Heteropolizaharide sau heteropolioze

Heteropoliozele sînt substanţe macromoleculare care conţin în structura lor *resturi de diferite oze sau de derivaţi ai acestora* şi prin *hidroliză dau hexoze, pentoze, acizi uronici, sulfaţi* sau *derivaţi de tipul metilpentozei, N-acetilgalactozoaminosulfat, N-acetilglucozamină* ş.a. Dintre heteropolioze fac parte *hemicelulozele, mucopoliozele acide, acidul condroitin sulfuric (condroitin sulfatul A şi C), dermatan sulfaţii, keratan sulfaţii, heparina şi derivaţii ei, acidul hialuronic, chitina, mucinele, gumele şi mucilagiile vegetale, mucopoliozele de grup, heteropolioza de tip III a pneumococcului, substanţele pectice ş.a.*

Substanţele pectice sau pectidele * sînt compuşi macromoleculari care se găsesc în *structura peretelui celular al plantelor, în fructe (mere, prune, pere, portocale, citrice, aproximativ* 30% ş.a.), *sfecla de zahăr* (25%), *bulbi şi fibrele vegetale.* În stare naturală se întîlnesc sub formă de *protopectină-moleculă gigantică,* alcătuită din numeroase catene poligalacturonidice metilate, lungi, puternic ramificate şi asociate, probabil cu molecule de galactani şi arabani.

Protopectina este insolubilă în apă şi conţine întotdeauna celuloză. Cu privire la natura chimică a protopectinei există în literatură mai multe ipoteze :

— protopectina este constituită din *acizi pectinici* legaţi de celuloză prin legături covalente ;

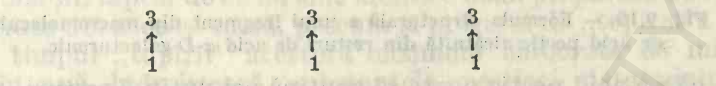
— protopectina constă din lanţuri de acizi pectinici, unite între ele prin intermediul ionilor de Ca^{2+}. Ultima presupunere se bazează pe observaţia că îndepărtarea ionilor de Ca^{2+} din preparatele şi soluţiile de protopectină este însoţită întotdeauna de creşterea solubilităţii acesteia în apă, precum şi pe faptul că şi alţi ioni bivalenţi (Ba^{2+} şi Sr^{2+}) pot stabiliza legătura dintre două catene de acid pectic.

---

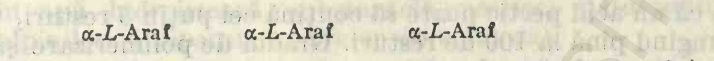
* Termenul de substanţe pectice se utilizează frecvent, îndeosebi, pentru grupa polizaharidelor vegetale complexe alcătuite în principal din acid *D*-galacturonic în timp ce termenul de pectină se foloseşte mai ales pentru polizaharidele acvosolubile care au proprietatea de a forma geluri.

În structura substanţelor pectice sau pectinelor componentul principal este acidul D-galacturonic, numeroase alte oze, *D*-galactoza, *L*-arabinoza, *D*-xiloza, *L*-ramnoza, *L*-fucoza — găsindu-se în cantităţi mult mai mici. Sub formă de urme în substanţele pectice se întîlnesc şi derivaţi ai xilozei: -2-*O*-metil-*D*-xiloza şi fucozei: 2-*O*-metil-*L*-fucoza. Unele oze alcătuiesc catene homopolizaharidice de tipul *L*-arabinan, *D*-galacturonan (constituent polizaharidic acid), *D*-galactan în interiorul macromoleculei heteropolizaharidului nativ. Natura legăturilor chimice din aceste părţi homopolizaharidice este diferită, după cum se poate vedea în continuare:

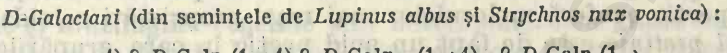
L-Arabinani (din seminţele de muştar şi din lemnul de *Pinus pinaster*)*



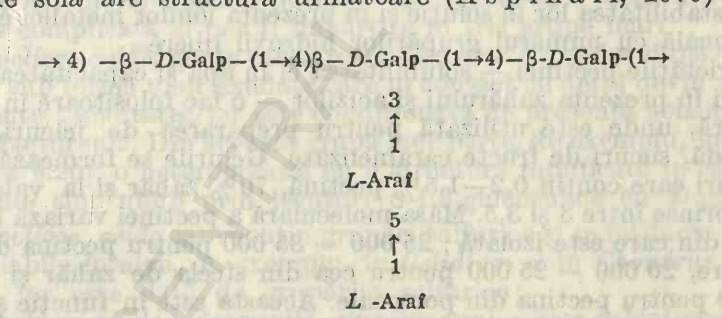
D-Galactani (din seminţele de *Lupinus albus* şi *Strychnos nux vomica*):



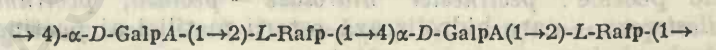
D-Galacturonani (din capitelul de *Helianthus annuus*):



Substanţele pectice conţin şi molecule heteropolizaharidice de tipul *L*-arabino-*D*-galactanilor izolaţi din seminţele de *Centrosema plumari* şi din *Glycine species*, în care catena principală este alcătuită din resturi de β-*D*-galactopiranoză, iar resturile de *L*-arabinofuranoză alcătuiesc catene laterale de diferite dimensiuni. *L*-arabino-*D*-galactanul izolat din cotiledoanele de soia are structura următoare (A s p i n a l l, 1970):



Din cotiledoanele şi tărîţele de soia s-a izolat şi un compus care conţine resturi de acid *D*-galacturonic şi de *L*-ramnoză unite între ele prin legături glicozidice de tipul 1→2 şi 1→4 astfel:



* f-forma furanozică; p-forma piranozică; A-acidul *D*-galacturonic

După structura chimică și proprietățile lor fizico-chimice se deosebesc trei clase de bază de substanțe pectice : *acizi pectici*, *acizi pectinici* și *protopectina* * .

Acidul pectic este reprezentantul cel mai simplu și există în stare pură, probabil, sub forma unui lanț neramificat, alcătuit din resturi de acid *D-galacturonic* unite între ele prin legături α-1,4-glicozidice (fig. 9.18). Se

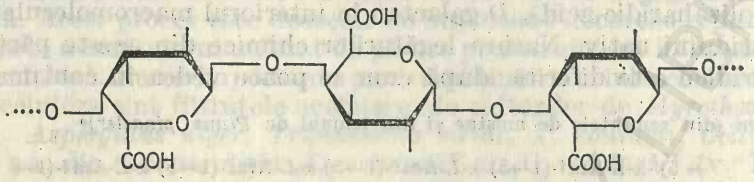


Fig. 9.19. — Formula structurală a unui fragment din macromolecula de acid pectic alcătuită din resturi de acid α-*D*-galacturonic.

apreciază că un acid pectic poate să conțină cel puțin 5 resturi, unele molecule ajungînd pînă la 100 de resturi. Gradul de polimerizare și structura acidului pectic conferă moleculelor mai mari proprietăți coloidale.

Acidul pectinic este de fapt un acid pectic în care grupările hidroxil libere au fost esterificate cu alcoolul metilic. Moleculele lui sînt formate din 100 pînă la 200 resturi de acid *D*-galacturonic și în prezența zahărului (zaharozei) și acizilor dă geluri denumite *pectine*. Determinarea gradului de metilare a acizilor pectinici este dificilă, deoarece legăturile esterice sînt ușor hidrolizate în cursul procesului de extracție din materialul vegetal. Se cunoaște însă că preparatele de acizi pectinici izolate de la specii vegetale diferite sînt deosebite ca grad de metilare și că moleculele de acizi pectinici nu sînt niciodată metilate integral. Stabilitatea și solubilitatea acizilor pectinici sînt în funcție de gradul de metilare al moleculelor lor : solubilitatea crește proporțional cu procentul de grupări hidroxil metilate, iar stabilitatea lor în soluție și în prezența ionilor metalici este invers proporțională cu numărul grupărilor hidroxil libere.

Proprietățile pectinei — solubilitatea ei în apă și capacitatea de a forma geluri în prezența zahărului și acizilor — o fac folositoare în industria alimentară, unde este utilizată pentru prepararea de jeleuri, gemuri, marmeladă, sucuri de fructe caramelizate. Gelurile se formează ușor din amestecuri care conțin 0,2—1,5% pectină, 70% zahăr și la valori de *p*H acide cuprinse între 3 și 3,5. Masa moleculară a pectinei variază în funcție de sursa din care este izolată : 25 000 — 35 000 pentru pectina din prune, mere, pere, 20 000 — 25 000 pentru cea din sfecla de zahăr și 40 000 — — 50 000 pentru pectina din portocale. Aceasta este în funcție și de perioada de vegetație (deoarece în timpul coacerii fructelor protopectina insolubilă trece în pectină care este solubilă) și de condițiile de conservare a fructelor.

Plantele superioare conțin numeroase enzime capabile să hidrolizeze substanțele pectice : *pectinester hidrolaze — pectaza*, *pectinmetoxilaza*, *pectinmetilesteraza* — care hidrolizează esterii metilici ai pectinelor meti-

* Polizaharidele în care o anumită cantitate din resturile de acid *D*-galacturonic este prezentă sub formă de esteri metilici sînt reunite sub termenul de *acizi pectinici* iar cele în care resturile acidului nu sînt esterificate — *acizi pectici*.

late, *poligalacturonazele-pectinaza, pectindepolimeraza, pectolaza* — care hidrolizează legăturile α-1,4-glicozidice din molecula substanţelor pectice şi *pectat liazele.* Galacturononazele sau galacturonazele pot acţiona asupra moleculelor pectinelor realizînd o hidroliză random (endoenzime) sau numai asupra resturilor terminale de acid *D*-galacturonic determinînd eliberarea de galacturonobioză (exoenzime). Din diferite microorganisme (*Aspergillus fonsecaeus, Bacillus polymyxa, Clostridium multifermentans* ş.a.) au fost izolate enzime care acţionează cu precădere asupra esterilor *D*-galacturonanilor sau numai asupra acidului pectic. În fructele de tomate a fost semnalată enzima *endopoligalacturonaza* care hidrolizează acidul pectic pînă la hidroliza lui completă fără să urmeze un mecanism de acţiune oarecare. Prezenţa unui echipament enzimatic atît de bogat în plante explică, probabil, faptul de ce nu sînt identice două preparate de substanţe pectice extrase din aceeaşi sursă, precum şi procesul de „topire" a inului şi cînepii (în timpul „topirii" acestora enzimele elaborate de microorganismele din apă hidrolizează substanţele pectice, determinînd „macerarea" tulpinilor şi separarea fibrelor de celuloză).

Gumele şi mucilagiile vegetale sînt heteropolioze cu grade de polimerizare diferite şi care prin hidroliză dau *galactoză, manoză, glucoză, ramnoză, xiloză* şi alte monoze. Ele au proprietatea de a reţine apa, formînd cleiuri, soluţii mucilaginoase şi geluri. *Gumele* sînt *secretate de anumite plante,* de exemplu, de *Accacia tropicali, Acacia senegal, A. Karroo, Angogeissus leiocarpus* etc. care secretă spontan sau după traumatizarea sau incizia plantei cunoscuta gumă arabică sau de ramurile şi *tulpinile traumatizate ale unor arbori* (vişini, pruni, migdali etc.). Ele se întîlnesc, de asemenea, şi în *seminţele de in, lucernă, trifoi, cînepă, secară* etc. Numeroase gume, îndeosebi, cele care se obţin prin incizia plantelor care cresc în ţările tropicale au proprietăţi sicative sau de agenţi emulsionanţi.

Gumele sînt heteroglucani puternic ramificaţi cu o structură chimică extrem de complicată şi pot fi împărţite în trei grupe mari.

Heteropolioze acide, gume care apar pe scoarţa copacilor după traumatizarea lor sub forma unor exudate care în contact cu aerul devin sticloase şi consistente. Aciditatea lor este condiţionată de prezenţa acizilor glucuronic şi galacturonic. Din această grupă face parte, de exemplu, guma arabică (figura 9.20), o heteropolioză cu o structură ramificată în care catenele laterale sînt unite prin legături β-1,3-glucozidice cu *D*-galactoza.

Heteropolioze acide care conţin grupări sulfurice şi se întîlnesc în cantităţi apreciabile în alge, de exemplu, în *Gelidium* şi în *Chondrus crispus*; aciditatea lor este dată de grupările sulfurice;

Heteropolioze neutre, de regulă glucomanani şi/sau galactomanani, se întîlnesc în seminţele plantelor (*Leguminoase, Liliaceae*) şi în tuberculi (unele specii din fam. *Araceae*) sub formă de substanţe de rezervă. *Guaranul* extras din *Gyamopsis tetragonolobus* şi *carabanul* obţinut din *Ceratonia Siligna* sînt folosite în industria alimentară.

Mucilagiile sînt *răspîndite în seminţe şi în scoarţa unor copaci* unde probabil au rolul de a *reţine apa,* preîntîmpinînd procesul de deshidratare. După natura chimică mucilagiile pot fi clasificate astfel:

— *mucilagiile de natură polizaharidică neutră,* în structura cărora se întîlnesc *D*-galacto-*D*-manani şi *D*-gluco-*D*-manani. În *seminţele plantelor*

leguminoase, lucernă, roşcovă etc. polizaharidul neutru este constituit din resturi de *D*-manoză şi *D*-galactoză care împreună alcătuiesc un *D*-galacto-*D*-manan. Resturile de manoză sînt unite într-un polizaharid liniar prin legături glicozidice de tipul 1→4, în timp ce resturile de galactopiranoză sînt ataşate lateral şi formează cu manipiranoza legături 1→6 de

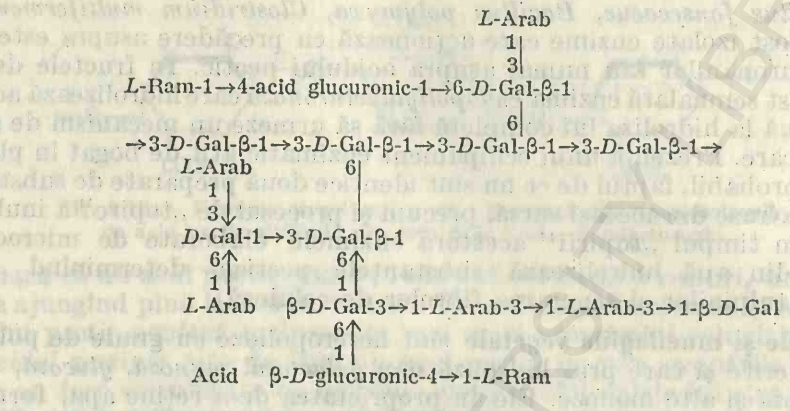


Fig. 9.20.—Schema formulei structurale a gumei arabice. Gal—galactopiranoză ; Arab — arabinoză, Ram — ramnoză. Guma arabică de diferite proveniențe are compoziții chimice diferite De exemplu, guma produsă de arborii din regiunea Sudanului conține resturi de *L*-arabinoză, *D*-galactoză, *L*-ramnoză şi acid *D*-glucuronic într-o proporție molară de aproximativ 3 :3 :3 :1. Gumele obținute din speciile vegetale de *Khaya, Sterculia arens* (India), *S. setigera* (Africa), (Australia) conțin mari cantități de polizaharide parțial acetilate.

tipul α-*D*-Galp 1→6-β-*D*-Manp. *D*-Gluco-*D*-mananii sînt răspîndiți în bulbii şi tuberculii unor plante şi sînt polizaharide liniare în care resturile de β-*D*-glucopiranoză şi β-*D*-manopiranoză în proporții de 1 : 1 pînă la 1 : 3 sînt unite prin legături 1→4. Endospermul cerealelor conține mucilagii de natură polizaharidică, acvosolubile, care sînt β-*D*-glucani liniari care conțin catene laterale de *L*-arabino-*D*-xilani ;

— *mucilagiile care sînt polizaharide acide* sînt alcătuite din catene de resturi de acid *D*-galacturonic şi ramnoză şi numai rareori conțin resturi de *L*-galactoză şi *L*-fucoză. Se întîlnesc la *plantele care secretă gume* şi legăturile glicozidice sînt diverse : 1→2 ; 1→3 ; 1→4 ;

— *amiloizii* sînt *polizaharide acvosolubile* întîlnite în *cotiledoanele multor seminţe, în pereţii celulari ai plantelor* şi sînt denumite astfel după reacția de culoare pe care o dau cu iodul. În structura lor au fost identificate resturi de β-*D*-glucopiranoză şi α-*D*-xilopiranoză ca principali constituenți, şi într-o cantitate relativ mică resturi de 2-*O*-β-*D*-galactopiranozil-α-*D*-xilopiranoză.

Hemicelulozele. Sub această denumire sînt reunite *poliozele macromoleculare*, insolubile în apă, dar mai uşor solubile în soluții alcaline în comparație cu celuloza. Hemicelulozele se găsesc în cantități apreciabile în *pereții celulari, în lemn* (17—41%) *ştiuleții de porumb, în paie, tărîțe, nuci, diferite seminţe*. În pereții celulari hemicelulozele însoțesc, de regulă, celuloza şi lignina. În preparatele de hemiceluloză sînt prezenți xilani, manani, glucomanani, galactani, arabani, uneori *L*-ramnoza, acidul

D-galacturonic ş.a. Prin hidroliză ele formează hexoze-manoză, galactoză şi pentoze-arabinoză, xiloză — şi în funcţie de specia sau de organul vegetal din care sînt extrase în compoziţia hemicelulozelor predomină una din aceste patru oze. Ca masă moleculară hemicelulozele sînt inferioare celulozei, deoarece gradul lor de polimerizare nu depăşeşte 120 de resturi de oze.

Numeroase hemiceluloze conţin pe lîngă hexoze şi pentoze şi *acizi uronici*, fiind alcătuite fie din resturi de xiloză şi *acid glucuronic*, fie din arabinoză şi *acid galacturonic*. De exemplu, paiele de grîu conţin o hemiceluloză alcătuită din acizi uronici-arabinoză şi xiloză în proporţie de 1 :1 :23. Uneori, în macromolecula de hemiceluloză acizii uronici sînt prezenţi sub formă de esteri metilici.

Hemicelulozele sînt o sursă importantă de materie primă pentru industria furfurolului, alcoolului etilic, hîrtiei, drojdiilor furajere etc.

Majoritatea hemicelulozelor sînt heteroglicani care conţin în molecula lor două pînă la patru, mai rar cinci sau şase, diferite resturi de monozaharide. Glicanii cei mai frecvent întîlniţi sînt *D*-gluco-*D*-manani, *D*-galacto-*D*-gluco-*D*-manani, *D*-galactani, *L*-arabino-*D*-glucurono-*D*-xilani, *L*-arabino-(4-*O*-metil-*D*-glucurono)-*D*-xilani, 4-*O*-metil-*D*-glucurono-*D*-xilani şi *L*-arabino-*D*-xilani. Macromolecula hemicelulozelor este ramificată şi adesea acetilată parţial.

D-gluco-D-mananii conţin formele β ale acestor două monoze sub formă de 4-*O*-β-*D*-glucopiranozil-*D*-manopiranoză şi 4-*O*-β-*D*-manopiranozil-*D*-glucopiranoză şi au catenă liniară de tipul :

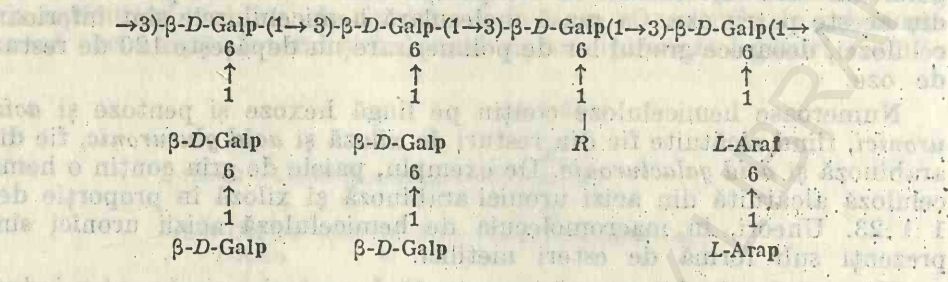
$$(1\rightarrow4)\text{-}(\beta\text{-}D\text{-Manp})_4\text{-}(1\rightarrow4)\text{-}(\beta\text{-}D\text{-Glcp})_2\text{-}(1\rightarrow4)\text{-}(\beta\text{-}D\text{-Manp})_4\text{-}(1\rightarrow4)$$
$$\text{-}(\beta\text{-}D\text{-Glcp})_2\text{-}(1\rightarrow4)\text{-}(\beta\text{-}D\text{-Manp})_4\text{-}(1\rightarrow4)\text{-}.$$

Heteroglicanii de tipul *D*-gluco-*D*-mananilor sînt răspîndiţi mai ales în *lemnul gimnospermelor, în seminţele de iris, bulbii de crin* etc. şi uneori conţin la una din extremităţi resturi de *D*-galactoză, grupuri terminale nereducătoare. În lemnul răşinoaselor proporţia dintre *D*-galactoză, *D*-glucoză şi *D*-manoză în molecula *D*-gluco-*D*-mananilor este de 1 sau 2 :10 :30. Hidroliza unor asemenea preparate a condus la concluzia că resturile de galactoză sînt unite cu resturile de β-*D*-manopiranoză prin legături de tipul 1→6, catena liniară a heteroglicanilor prezentînd astfel o uşoară ramificare.

D-galacto-D-gluco-D-mananii se întîlnesc în lemnul gimnospermelor şi conţin resturi de β-*D*-glucopiranoză legate 1→4 cu resturile de β-*D*-manopiranoză ; α-*D*-galactoza formează cu monozele din catena liniară legături glicozidice de tipul 1→6 şi dă naştere unor catene laterale scurte. Aceste catene laterale conferă macromoleculelor o mai mare solubilitate în apă, preîntîmpinînd formarea unor punţi intermoleculare de hidrogen. *D*-galacto-*D*-gluco-*D*-mananii sînt parţial *O*-acetilaţi.

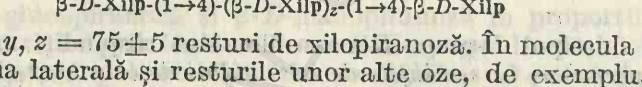
L-arabino-D-galactanii se întîlnesc mai ales în *lemnul coniferelor*, unde cantitatea lor poate ajunge pînă la 25% în speciile genului *Larix*. Moleculele de *L*-arabino-*D*-galactani conţin resturi de *L*-arabinofuranoză şi *D*-galactopiranoză în proporţii variabile — 1 :4 ; 1 :8 ; 1 :6 — şi preparatele lor obţinute prin extracţia masei lemnoase înainte de delignificarea ei reprezintă de cele mai multe ori un amestec de două componente cu struc-

turi similare, dar cu mase moleculare distincte — 100 000 și respectiv 160 000. În principiu, pe baza analizelor efectuate molecula lor poate fi reprezentată astfel (Whistler și Richardo, 1970):



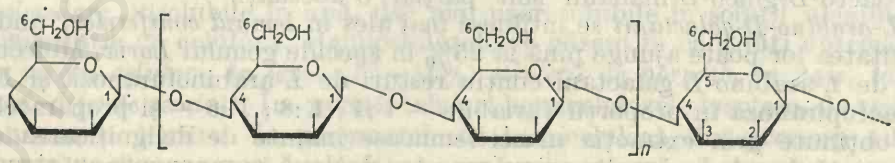
unde R poate fi un rest de acid β-*D*-glucopiranoziluronic, β-*D*-galactopiranoză sau *L*-arabinofuranoză. De menționat că *L*-arabino-*D*-galactanii izolați din alte specii conțin și resturi de *L*-ramnoză, α-*D*-xilopiranoză, β-*L*-arabinopiranoză și au structură care variază de la o specie la alta.

D-Xilanii din hemiceluloze sînt răspîndiți la plantele anuale care conțin între 15 și 30% xilani, la esențele lemnoase tari — 20—25% și la rășinoase — 7—12% și sînt alcătuiți din resturi de β-*D*-xilopiranozil unite prin legături glicozidice de tip 1→4. Molecula *D*-xilanilor, de regulă liniară, prezintă o singură ramificație, localizată la nivelul unei grupări hidroxil din poziția 3 a restului de *D*-xiloză și poate fi redată schematic astfel:



unde $x, y, z = 75 \pm 5$ resturi de xilopiranoză. În molecula lor se pot întîlni în catena laterală și resturile unor alte oze, de exemplu, acid α-*D*-glucopiranoziluronic, legat de resturile de *D*-xilopiranoză prin legături α-*D*-(1→2) glicozidice. Xilanii izolați din preparatele de hemiceluloză obținute din *Myrothecium verrucaria, Streptomyces xylanose, Pinus pinaster, Pinus radiata* etc. conțin în molecula lor resturi de arabinofuranoză în cantități relativ mari, molecula lor fiind puternic ramificată și reprezentînd de fapt o moleculă de *L-arabino-D-xilani*.

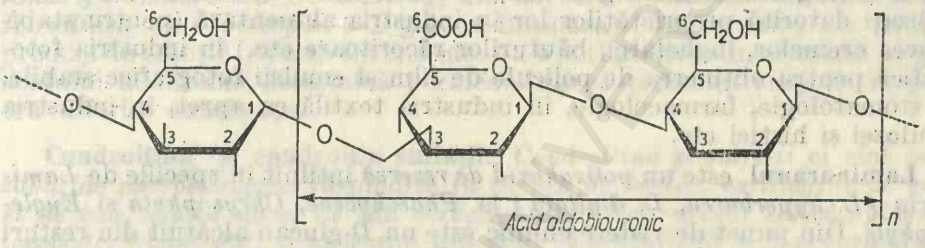
L-mananii sînt *polizaharide* răspîndite în *endospermul semințelor de palmieri, în boabele de cafea verde, tuberculii orhideelor* și în alga *Porphyra umbilicalis*. După solubilitatea lor în soluții alcaline se deosebesc două feluri de manani: *D*-mananii *A* și *D*-mananii *B*, ambele din punct de vedere chimic reprezentînd polimeri liniari alcătuiți din resturi de *D*-manopiranoză unite prin legături β-(1→4)-glicozidice:



9.3.3 Polizaharide bacteriene

Bacteriile şi fungii conţin sau secretă numeroase polizaharide cu structuri chimice variate. Aceste polizaharide sînt *părţi constituente ale pereţilor celulari*, sînt *prezente în capsulele microbiene sau sînt elaborate în mediul de cultură ca polizaharide extracelulare*. Reacţiile de precipitare antigen-anticorp, reacţiile de aglutinare bacteriană şi unele reacţii de aglutinare încrucişate sînt produse de bacterii sau de extractele de celule bacteriene, valoarea imunogenă a antigenelor cît şi specificitatea lor de reacţie datorîndu-se macromoleculelor de polizaharide.

Polizaharidele bacteriene după structura lor chimică se împart în *homopolizaharide* * *şi heteropolizaharide bacteriene*. Polizaharidul specific bacteriei gram-pozitive *Pneumococcus* tip III este un heteropolizaharid care prin hidroliză pune în libertate cantităţi echimolare de acid glucuronic şi glucoză avînd la bază unitatea care se repetă în moleculă — acidul alvobiouronic. Heteropolizaharidul Pneumococului tip III are, probabil, următoarea structură:



→ 3)-β-*D*-GlcAp-(1→4)-β-*D*-Glcp-(1 → 3)-β-*D*-GlcAp-(1 →

La bacteriile gram-negative compoziţia polizaharidelor şi a antigenelor de suprafaţă diferă de la un organism la altul şi de la forma „netedă" la forma „rugoasă". Antigenele specifice pentru capsulă, forma netedă şi forma rugoasă au fost denumite antigene *K*, *O* şi *R*, iar la unele bacterii, de exemplu, la *Salmonella* antigenele *O* ale formei netede au fost subîmpărţite în grupele *A*, *B* şi *C*. Fiecare caracter al antigenului este rezultatul unei structuri particulare a polizaharidelor de suprafaţă. Specificitatea serologică caracteristică acestor heteropolizaharide este conferită de grupările situate la extremitatea lor nereducătoare.

Heteropolizaharidele bacteriene sînt constituite din resturi de *D*-galactoză, *D*-glucoză, *D*-manoză şi *D*-ramnoză, rar întîlnindu-se în cantităţi mai mici şi resturi de 2-amino-2-deoxi-*D*-glucoză, 4-acetamido-4,6-dideoxi-*D*-galactoză, acid 2-acetamido-2-deoxi-*D*-galacturonic, 6-deoxi-*D*-taloză, *D*-riboză etc.

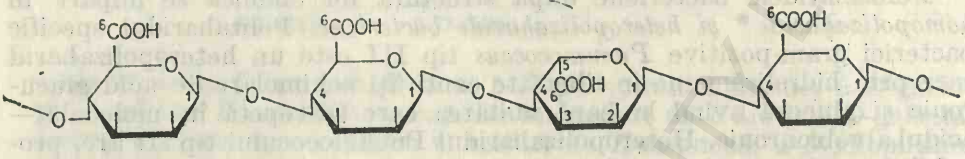
Acidul alginic este un polizaharid de structură răspîndit la *Phaeophyceae* unde se găseşte sub formă de complecşi insolubili, alginaţi de magneziu, potasiu, sodiu şi calciu. *Acidul alginic* este insolubil în apă, dar este uşor solubil în soluţiile apoase ale hidroxizilor metalici sau ale carbonaţilor cu care dă soluţii vîscoase.

---

* Vezi subcapitolul precedent (9.3.1)

Din punct de vedere chimic cea mai mare parte a moleculei de acid alginic este constituită din resturi de acid *D*-manuronic unite prin legături glicozidice β-*D*-(1→4) și într-o mai mică proporție din resturi de acid α-*L*-guluronic unite prin același tip de legătură glicozidică. Studiile structurale întreprinse asupra acestui polizaharid au arătat că macromolecula lui care are o masă moleculară de aproximativ $4{,}6-37 \times 10^4$ conține regiuni cristaline alcătuite din resturi de acid-*D*-manuronic și acid *L*-guluronic, precum și porțiuni amorfe în care se găsesc ambii acizi.

În principiu structura acidului alginic poate fi reprezentată schematic astfel :



Alginații și acidul alginic prezintă o importanță comercială deosebită, anual extrăgîndu-se din algele marine aproximativ 10 mii de tone, fiind utilizați datorită proprietăților lor în industria alimentară (pentru stabilizarea cremelor, înghețatei, băuturilor răcoritoare etc.) în industria fotografică pentru obținerea de pelicule de film și emulsii fotografice stabile, în stomatologie, farmacologie, în industria textilă ca apret, în industria celulozei și hîrtiei etc.

Laminaranul este un *polizaharid de rezervă* întîlnit în speciile de *Laminaria (L. hyperbarea, L. digitata)* la *Phaeohyceae, Chrysophyta* și *Euglenophyte*. Din punct de vedere chimic este un *D*-glucan alcătuit din resturi de β-*D*-glucopiranoză unite între ele prin legături glicozidice 1→3, este solubil în apă și are o masă moleculară de aproximativ 2 600—4 000 daltoni. În molecula diferitelor preparate de laminaran au fost identificate și resturi de *D*-manitol, care uneori formează aproximativ 2% din moleculă.

9.3.4 Mucopolizaharide

Mucopolizaharidele sînt substanțe extracelulare larg *răspîndite în țesutul conjunctiv*, unde în stare nativă sînt legate covalent cu proteinele formînd glicoproteine sau proteoglicani (complecși polizaharido-proteici). Această clasă de compuși controlează metabolismul apei, ionilor, diferiților compuși ai metabolismului intermediar, induce procesul de calcifiere etc. și din punct de vedere chimic este microeterogenă atît ca structură chimică a reprezentanților cît și ca proprietăți fizico-chimice.

Dintre mucopolizaharide fac parte *acidul hialuronic, condroitina și acidul condroitin sulfuric, dermatan sulfatul, keratan sulfatul I, keratan sulfatul II, heparina și N-acetilheparan sulfatul.*

Acidul hialuronic este un heteropolizaharid alcătuit din părți egale de acid *D*-glucuronic și 2-acetamido-2-deoxi-*D*-glucoză. Denumirea lui derivă de la faptul că a fost *izolat din umoarea vitroasă (hialoid) și ulterior din cordonul ombilical, lichidul sinovial, cornee, dermă, țesut conjunctiv,*

peretele arterial etc. Se caracterizează printr-o viscozitate mare și prin capacitatea de a reține importante cantități de apă în spațiile intercelulare. În soluție prezintă o viscozitate mare și dublă refracție de curgere.

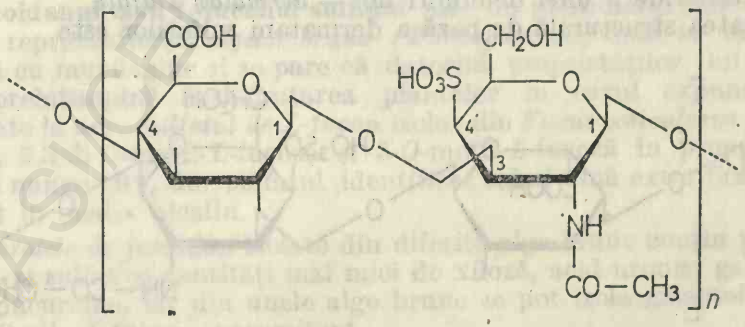
Datorită structurii lor macromoleculare, liniare, puternic polimerizate și fibrilare acidul hialuronic constituie la nivelul țesutului conjunctiv o barieră eficace contra pătrunderii germenilor infecțioși și a substanțelor toxice.

Acidul hialuronic este o substanță cu masa moleculară mare care variază între 2×10^5 și 9×10^6 în funcție de sursa și metoda de extracție folosită; prin hidroliza lui cu acid sulfuric diluat sau pe cale enzimatică rezultă un dizaharid: acidul-2-amino-2-deoxi-3-*O*-(β-*D*-glucopiranoziluronic)-*D*-glucoză denumit și *acidul hialobiouronic* cu o structură de tipul (1→3)-*O*-(2-acetamido-2-deoxi-β-*D*-glucopiranozil)-(1→4)-*O*-β-*D*-glucopiranuronozil care în structura polimerului natural alternează în mod regulat, formînd legături glicozidice 1→3 și 1→4.

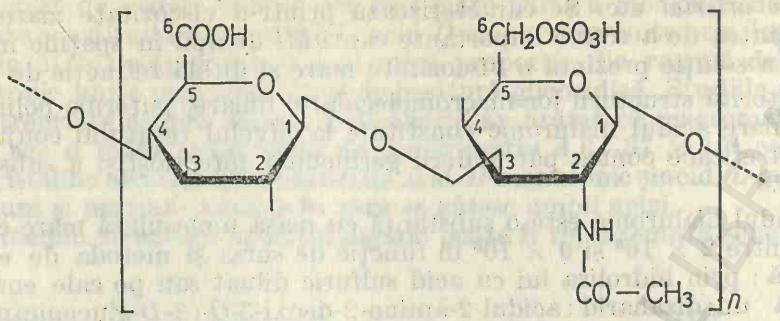
Acidul hialuronic este hidrolizat enzimatic de diferite enzime cunoscute sub denumirea generică de hialuronidaze, extrase din testicule (*hialuronat glicanhidrolaza* EC 3.2.1.35) din bacterii (*hialuronat kinaza*) și din *Hirudinea sp.* (endopoli-β-*D*-glucoziduronaza), cu formare de diferiți produși de reacție. Aceste enzime care au o acțiune depolimerizantă asupra acidului hialuronic determină permeabilizarea țesutului conjunctiv pentru diferite substanțe.

Condroitina și condroitin sulfații. *Condroitina și sulfații* ei sînt *polizaharide microeterogene* răspîndite *în carnea de bovine, cartilagiile de porc și de bou, septul nazal de cal, cordonul ombilical, urină, salivă, plasmă, leucocite, trahee* etc. și alcătuite din acid *D*-glucuronic și 2-acetamido-2-deoxi-*D*-galactoză și resturi de acid sulfuric esterificate la C_4 sau C_6. Condroitina și sulfații ei se găsesc în mucopolizaharidele cartilajelor.

Unitatea structurală de bază a acestor compuși care se repetă de mai multe ori în macromolecula lor este *acidul condroitin sulfuric* format din condrozamina sau 2-deoxi-2-aminogalactoza și restul acidului glucuronic unite între ele printr-o legătură glicozidică β-1→3. În funcție de poziția restului de acid sulfuric, care poate fi esterificat la hidroxilii din poziția C_4 și C_6 se deosebesc *acidul 4-condroitinsulfuric* sau *condroitinsulfatul A* și *acidul 6-condroitin sulfuric* sau *condroitinsulfatul C*

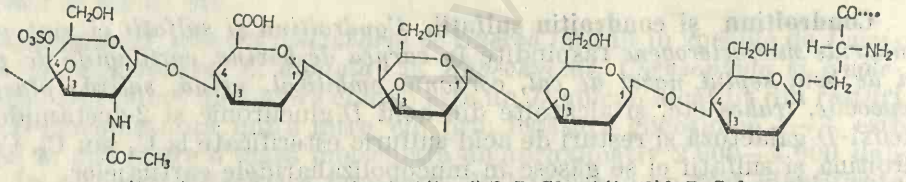


(1→3)-*O*-(2-acetamido-2-deoxi-β-*D*-galactopiranozil-4-sulfat)-1(1→4)-*O*-β-*D*-glucopiranuronozil.



(1→3)-*O*-(2-acetamido-2-deoxi-β-*D*-galactopiranozil-6-sulfat)-(1 → 4)-*O*-β-*D*-glucopiranuronozil

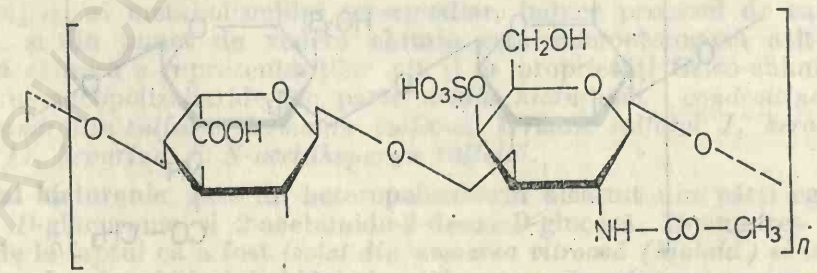
Acizii condroitinsulfurici sînt substanţe cu viscozitate mare şi putere de reţinere a apei, larg răspîndite în ţesutul conjunctiv unde sînt legaţi covalent de molecule de natură proteică şi îndeplinesc un important rol în procesele de calcifiere a cartilajiilor. Masa moleculară a acestor mucopolizaharide variază între 300 000 şi 500 000 de daltoni, iar a acizilor condroitinsulfurici din structura lor este de aproximativ 50 000 şi molecula unui mucopolizaharid conţine 60 pînă la 65 catene de acid 4-condroitinsulfuric. J e a n l o z (1970) propune următoarea structură şi tip de legătură pentru mucopolizaharide



(1→3)-β-*D*-Galp*NAc*-4-sulfat(1→4)-β-*D*-Glcp*A*(1→3)β-*D*-Galp
(1→3)-β-*D*-Galp-(1→4)-β-*D*-Xilp-(1→0)-*L*-Ser.

Dermatan sulfaţii. *Dermatan sulfaţii sînt polizaharide* răspîndite în *dermă, mucoasa gastrică, creier, splină, cordon ombilical, plămîni* şi însoţesc, de regulă, în unele formaţiuni morfologice acidul hialuronic. Datorită unor asemănări structurale cu acizii condroitin sulfurici au fost denumiţi şi condroitin sulfaţi *B*, iar datorită activităţii lor anticoagulante—β-heparine. Studiul structurii şi proprietăţilor lor a îndreptăţit conferirea acestor polizaharide a unei denumiri noi — *dermatan sulfaţi.*

Unitatea structurală de bază a dermatani sulfaţilor este

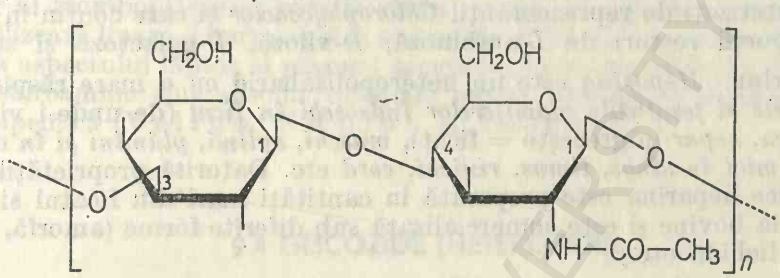


(1→3)-*O*-(2-acetamido-2-deoxi-β-*D*-galactopiranozil-4-sulfat)-(1→4)-*O*-α-iduropiranuronozil.

Dermatanii sînt hidrolizați de numeroase enzime izolate din *Flavobacterium heparinum* și *Proteus vulgaris*, care sînt folosite și pentru determinarea condroitin sulfaților și dermatan sulfaților în prezența altor mucopolizaharide.

Keratan sulfații. *Keratan sulfații* au fost descoperiți de Meyer și alții (1953) și diferă de condroitin sulfați prin faptul că ei conțin *D*-galactoză și nu au acid hexuronic. După digestia enzimatică a unui polizaharid autorii au identificat resturile de *D*-galactoză, 2-acetamido-2-deoxi-*D*-glucoză și de sulfați în proporție de 1 : 1 : 1. Ulterior, s-a demonstrat că unii keratan sulfați conțin și resturi de *L*-fucoză, acid sialic și amino-acizi. Ei au fost *separați din corneea de bovine, cartilagii, țesut conjunctiv* etc. Keratanul izolat din cornee se numește keratan sulfat *I* și conține *D*-galactoză și N-acetil-D-glucozamină-6-sulfat, iar cel izolat din țesuturile striate — keratan sulfat *II* și este alcătuit din *D*-galactoză și N-acetil-*D*-galactozamină-6-sulfat.

Unitatea structurală de bază a keratan sulfaților este (1 → 3)-*O*-β-*D*-galactopiranozil-(1→4)-*O*-2-acetamido-2-deoxi-β-*D*-glucopiranozil :



Resturile *D*-galactozil, în proporție de 40%, iar resturile de 2-acetamido-2- deoxi-*D*- glucozil în proporție de 70% sînt esterificate cu grupări sulfat la nivelul atomului C_6. Molecula de keratan sulfat este legată covalent prin două tipuri de legături cu proteinele: prin intermediul *N*-acetilglucozilaminei și al azotului amidic al asparaginei sau glutaminei formează o legătură covalentă rezistentă la hidroliza alcalină, iar prin intermediul resturilor de serină și treonină o legătură labilă. Ambele legături sînt de natură glicozidică.

9.3.5 Polizaharide cu S

Fucoidanul sau L-fucanul sulfatat este un polizaharid sulfatat răspîndit la reprezentanții *algelor brune (Phaeophyceae)* unde se întîlnește împreună cu mucilagiile și se pare că datorită proprietăților lui higroscopice preîntîmpină deshidratarea plantelor în cazul expunerii lor îndelungate la aer. *Sulfatul de L-fucan* izolat din *Fucus vesiculosus* conține *L*-fucoză, 2,3-di-*O*-metil-*L*-fucoză și 3-*O*-metil-*L*-fucoză în proporție de 1 : 1 : 3 și numai 10% din sulfatul identificat sub formă exterificată este hidrolizat în mediu alcalin.

Preparatele de fucoidan izolate din diferite alge brune conțin pe lîngă *L*-fucoză și sulfat și cantități mai mici de xiloză, acid uronic, galactoză, acid *D*-glucuronic, iar din unele alge brune se pot izola galactofucan și galacto-*D*-xilo-*L*-fucan concomitent.

La *Rhodophyceae* se întîlnesc *L*- și *D*-galactanii sulfatați care conțin în proporții diferite *D* și *L*-galactoză, 3,6-anhidro-*D* și *L*-galactoză, 6-*O*-metil-*D*-galactoză. Din această clasă de compuși fac parte *agaroza, agaropectina, k-carragenarul* și λ-*carragenanul, furcelaranul, funoranul* și altele (denumite astfel după genul sau specia de alge din care au fost extrase). Aceste molecule au mase moleculare mari, cuprinse între 5 000—110 000 pentru agar, între 260 000 și 320 000 pentru *k*-carragenan și între 330 000 și 800 000 pentru λ-carragenanan și sînt folosite în industria alimentară care necesită procese de gelificare, în microbiologie și în biochimie.

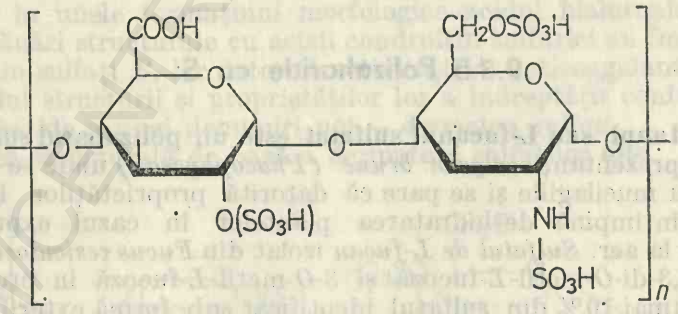
Mucilagii sulfatate sînt *D-glucurono-D-xilo-L-ramnanii* sintetizați de algele verzi *Enteromorpha compressa* și *Ulva lactuca*, (care conțin resturi de *L*-ramnoză, *D*-xiloză, acid *D*-glucuronic și urme de *D*-glucoză, deci sînt heteropolizaharide) precum și *L-arabino-D-xilo-D-galactanii* sulfatați sintetizați de reprezentanții *Chlorophyceaelor* și care conțin în diferite proporții resturi de *L*-arabinoză, *D*-xiloză, *D*-galactoză și sulfat.

Heparina. *Heparina* este un heteropolizaharid cu o mare răspîndire în *lichidele și țesuturile mamiferelor îndeosebi în ficat* (de unde-i vine și denumirea, *hepar* în greceşte = ficat), *mușchi, splină, plămîni și în cantități mai mici în sînge, timus, rinichi, cord* etc. Datorită proprietăților ei terapeutice heparina este preparată în cantități mari din ficatul și plămînii de la bovine și este comercializată sub diferite forme (amorfă, cristalizată, lichidă etc.).

Masa moleculară a preparatelor de heparină variază între 8 000 și 20 000 de daltoni. Din punct de vedere chimic heparina este componenta unei familii de polizaharide care cuprinde *heparin monosulfatul, heparansulfatul* sau *heparitinsulfatul* și care prin hidroliză pun în libertate resturi de *2-acetamido-2-deoxi-D-glucopiranozil*, de *acid* β-*D-glucopiranoziluronic*, de *acid L-iduropiranoziluronic, O-sulfat, N-sulfat, grupări N-acetil* etc.

Unitate structurală de bază care se repetă în molecula heparinei s-a stabilit după numeroase studii că este reprezentată de

(1→4)-*O*-2-deoxi-2-sulfoamino-α-*D*-glucopiranozil-6-sulfat)-(1→4)-*O*-α-*D*-glucopiranuronozil-



Gradul de esterificare cu sulfați a moleculelor de heparină nu este uniform, variază dintr-o regiune a moleculei în alta, deși unii autori acreditează ideea că șapte din opt resturi de acid glucuronic sînt esterificate la nivelul grupării hidroxil.

Heparan sulfatul sau heparitin sulfatul este o heparină mono esterificată la nivelul grupării *N*-acetil, separată din ficat și care a fost identifica și în aorta umană și animală, în urină, în oviductul de găină etc.

Heparina se leagă de molecula proteică prin intermediul unei legături covalente care se formează între un oligozaharid și restul de *L*-serină al proteinei,

O-β-*D*-GlcpA-(1→3)-*O*-β-*D*-Galp(1→3)-*O*-β-*D*-Galp-(1→4)-β-*D*-Xilp-(1→0)-*L*-serină

legătură care reamintește de modalitatea de legare a acizilor condroitin-4-sulfuric.

Heparina este o substanță anticoagulantă comportîndu-se ca un inhibitor al tromboplastinei, care la rîndul ei inhibă acțiunea trombinei. Ea stabilizează lipaza determinînd la animalele cu lipemie accentuată îndepărtarea aspectului lăptos al plasmei sanguine. În structura heparinei grupările sulfoamino sînt absolut esențiale pentru acțiunea anticoagulantă și antilipemică (V e l l u z, N o m i n e și P i e r d e t).

9.4 GLICOZIDE (HETEROZIDE)

Glicozidele sau *heterozidele* sînt compuși *alcătuiți dintr-o componentă glucidică* care poate fi un mono- di- sau oligozaharid *și o componentă neglucidică*, denumită *aglicon*, a cărei structură chimică poate fi foarte diferită — grupare nitril, hidroxil (alcool, fenol), carbonil (aldehidă), cian, flavonă, steroid etc. Agliconul conferă glicozidelor proprietăți fizice, chimice și farmacologice specifice condiționînd în cea mai mare măsură utilizarea lor ca substanțe terapeutice.

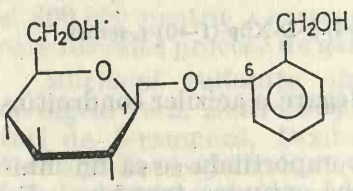
Majoritatea glicozidelor naturale sînt *O*-glicozidice și teoretic rezultă prin condensarea care are loc între gruparea semiacetalică a ozei cu gruparea hidroxil a unui alcool sau a unui fenol sau prin condensarea grupării sulfhidril cu gruparea semiacetalică în cazul tioglicozidelor. Sînt substanțe nereducătoare, optic active, care prezintă izomeri α și β și după natura agliconului pot fi clasificate în *glicozide alifatice, aromatice* și *heterociclice.*

Glicozide alifatice. Dintre cele mai simple și mai bine cunoscute glicozide alifatice sînt α și β-*D*-metilglucopiranozidele izolate de la reprezentanții *Rhamnaceae* și hidrolizate de enzime specifice fiecărei forme (maltaza este o α-glicozidază, iar *emulsia* extrasă din semințele migdalului amar o β-glicozidază).

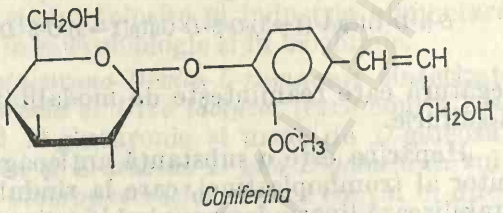
Din diferite *plante (alge, licheni, sfecla de zahăr)* și de la unele *microorganisme* au fost izolate glicozide care conțin resturi de glicerol de tipul 2-*O*-α-*D*-galactopiranozilglicerol sau *O*-α-*D*-galactopiranozil-(1→6) *O*-β-*D*-galactopiranozil-(1→1)-glicerol etc.

Glicozide aromatice. Sînt substanțe care conțin în calitate de aglicon fenolii sau compușii analogi fenolilor. Datorită structurii lor chimice

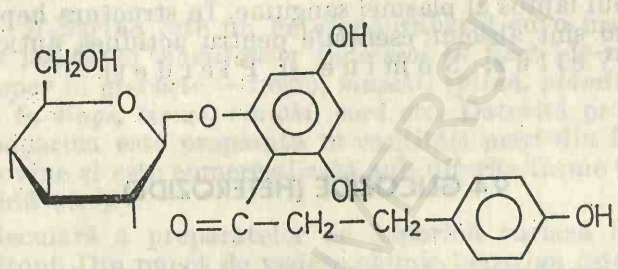
sau proprietăţilor lor farmacodinamice glicozidele aromatice au fost utilizate pentru studiul specificităţii de substrat a enzimelor *(salicina)*, determinarea diabetului florizinic experimental la animalele de laborator prin blocarea resorbţiei tubulare a *D*-glucozei în rinichi *(florizina)* sau pentru studiul reacţiilor de polimerizare prin dehidrogenare enzimatică *(coniferina)* :



Salicina



Coniferina

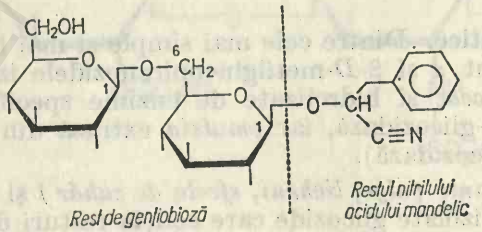


Florizină

2',4',6'-Trihidroxi-3-(4"-hidroxifenil) propiofenonă

Dintre glicozidele aromatice fac parte şi *siringina*, *geina*, *populina*, *naringina* ş.a.

Glicozide cianogenetice. Cel mai cunoscut glicozid cianogenetic este *amigdalina* izolată din *migdalele amare* şi din *seminţele unor specii din familia Rosaceae* şi hidrolizată de o enzimă cunoscută sub denumirea de *emulsină*. Acest glicozid conţine în structura lui un dizaharid — *gentiobioză* şi un aglicon — nitrilul *acidului mandelic* :



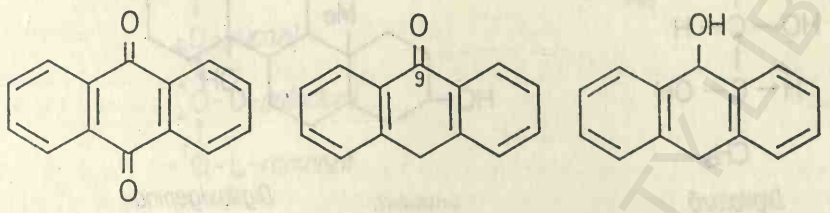
Rest de genţiobioză

Restul nitrilului acidului mandelic

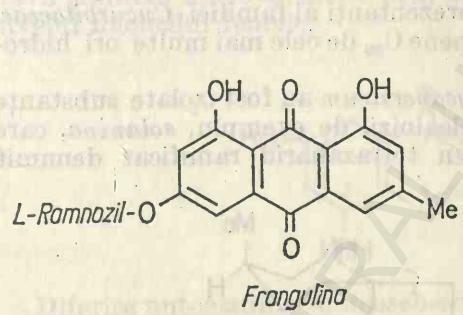
Emulsina hidrolizează acest glicozid cu formare de benzaldehidă, acid cianhidric şi *D*-glucoză. Un alt glicozid care conţine ca aglicon nitrilul acidului mandelic este *vicianina* izolată din *Vicia angustifolia*. Componenta

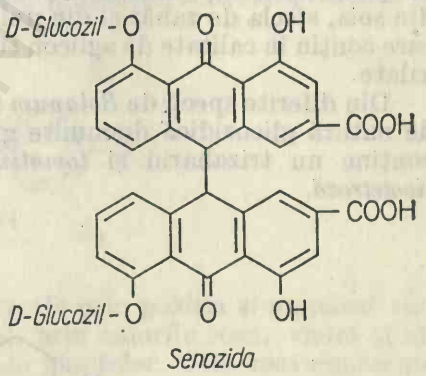
glucidică a acestui glicozid este *O*-α-L-arabinopiranozil-(1→6)-β-*D*-glucoza. Vicianina este, de asemenea, hidrolizată de emulsină ceea ce a sugerat faptul că această denumire încorporează în ea mai multe enzime cu specificităţi de acţiune diferite.

Glicozide antracenice. Compuşii din această categorie conţin în calitate de *aglicon* diferiţi derivaţi oxidaţi sau reduşi ai antracenului : *antrachinonă, antronă şi antranol.*



Glicozidele antracenice au fost izolate din *rădăcinile* de *Rubia tinctorum* şi *Rheum officinale* precum şi din *frunzele* de *Rhamnus frangula* şi în majoritatea cazurilor sînt folosite ca purgative. Din această categorie fac parte *frangulina* şi *senozida,* ultima reprezentînd un *bis* (*D*-glucozidă) a diantronei :

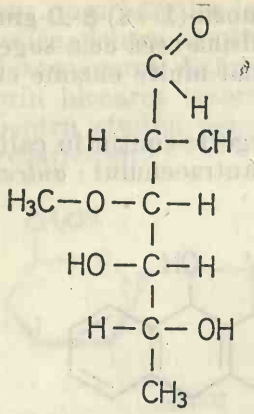




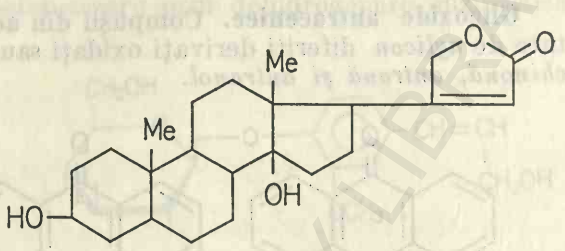
Glicozide fenantrenice. *Glicozidele fenantrenice* conţin un aglicon de tip steroidic şi sînt utilizate cu precădere în calitate de *cardiotonice,* diminuînd pulsul, regularizînd ritmul şi bătăile inimii şi acţionînd, uneori şi ca diuretic. Acest tip de glicozide este răspîndit în frunzele de *Scrophulariaceae, Apocynaceae* şi *Liliaceae* şi multe din glicozidele fenantrenice conţin *D*-glucoză şi un deoxizaharid avînd structura generală :

$$\text{Aglicon-(deoxizaharid)}_x\text{-(}D\text{-glucoză)}_y$$

Digitonina este principalul glicozid cardiac extras din *Digitalis purpurea* şi *Digitalis lanata* şi are în structura lui 3-metil-*D*-fucoza sau digitaloza, un deoxizaharid, iar în calitate de aglicon—*digitoxigenina.*



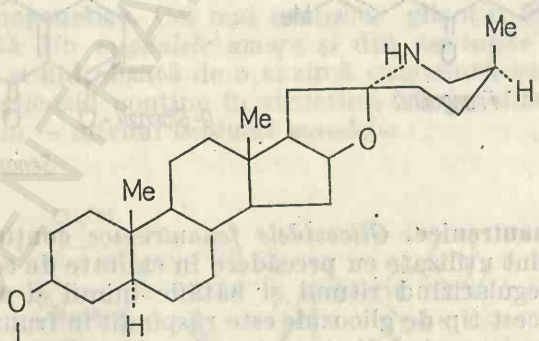
Digitaloză



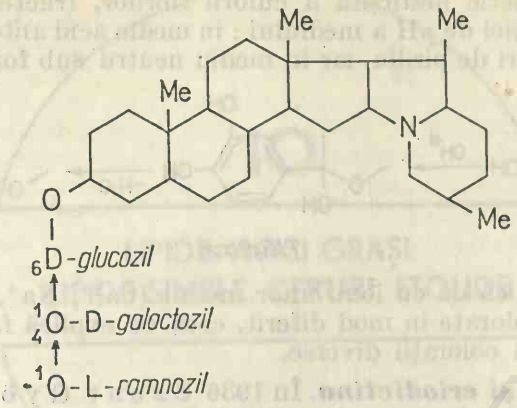
Digitoxigenina

Dintre glicozidele fenantrenice fac parte și saponinele răspîndite îndeosebi la reprezentanții familiilor *Dioscoreaceae*, *Amaryllidaceae*, *Liliaceae*, *Scrophulariaceae*, care sînt glicozide cu acțiune hemolitică cînd sînt administrate intravenos, toxice pentru animalele poikiloterme, în special, pentru pești și care conțin în structura lor *D*-glucoză, *L*-ramnoză, *D*-galactoză și *D*-xiloză. Structura lor chimică nu este pe deplin elucidată, în special în ceea ce privește partea glucidică a moleculei. Dintre saponine fac parte *tigonina*, *gitonina*, *digitonina*, *holoturina* etc., precum și saponinele din soia, sfecla de zahăr și din unii reprezentanți ai familiei *Cucurbitaceae*, care conțin în calitate de aglicon triterpene C_{30} de cele mai multe ori hidroxilate.

Din diferite specii de *Solanum* și *Lycopersicum* au fost izolate substanțe de natură glicozidică denumite glicoalcaloizi, de exemplu, *solanina*, care conține un trizaharid și *tomatina*, un tetrazaharid ramificat denumit *licotetroză*.



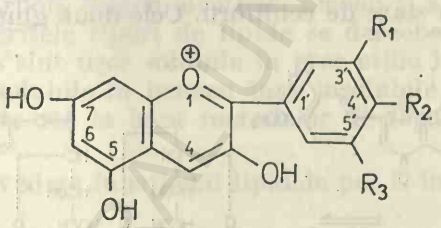
Tomatina



Solanina

Solanina este răspîndită în frunzele, bulbii și în mugurii (colții) cartofului, în vinete și în general la reprezentanții din familia *Solanaceae*.

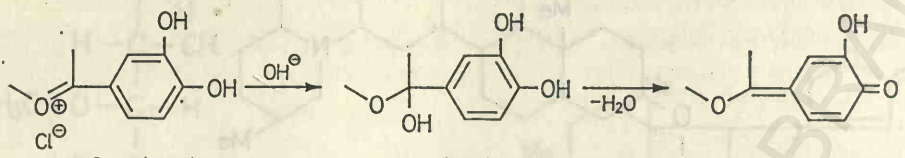
Glicozide antocianidinice sînt pigmenți răspîndiți în flori, fructe și frunze care își schimbă culoarea în funcție de *p*H celular. W i l l s t ä t t e r introduce în 1913 termenul de *antociane* pentru a denumi glicozidele din această categorie și de *antocianidine* pentru agliconii corespunzători lor. Antocianidinele au în structura lor un nucleu comun, 3, 5, 7-trihidroxiflavil și diferă unele de altele prin numărul grupărilor hidroxil prezente la nivelul nucleului fenolic.



Diferite antocianine se deosebesc între ele prin poziția și numărul resturilor zaharidice și a grupărilor metoxil, prin culorile roșu, violet și albastru în care colorează diferite părți ale plantelor. Cele mai cunoscute antocianine sînt *peonina, malvina, cianina, delfinina, pelargonina, rutinul* și altele. În continuare este redată formula structurală a peoninei componentă sexuală specifică a gametului de la alga *Chlamidomonas*

Peonina

Varietatea practic nesfîrșită a culorii florilor, fructelor și frunzelor se datorește variației de *p*H a mediului : în mediu acid antocianii se găsesc sub formă de săruri de piriliu, iar în mediu neutru sub formă chinoidică :

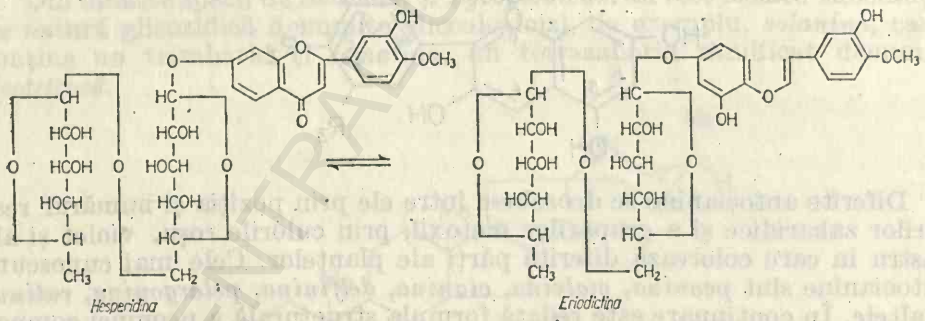


Sare de piriliu — *Pseudobază* — *Formă chinoidică*

Forma chinoidică dă cu ionii unor metale (Ca^{2+}, Na^{+}, K^{+}) săruri denumite fenolați colorate în mod diferit, ceea ce explică faptul că același antocian poate da colorații diverse.

Hesperidina și eriodictina. În 1936 Szent György și alții au observat că simptomele scorbutului, îndeosebi friabilitatea și permeabilitatea crescută a capilarelor sanguine, nu sînt complet îndepărtate prin tratarea cu preparate de acid ascorbic cristalizat. Folosirea sucului de lămîie și a altor surse naturale bogate în vitamină *C* restabilesc elasticitatea vaselor sanguine, ceea ce determină pe cercetători să formuleze ipoteza că în sucul de lămîie și în alte produse naturale bogate în vitamina *C* există încă o substanță, diferită de acidul ascorbic și denumită *vitamina P.*

Vitamina *P* este din punct de vedere chimic o heterozidă și face parte din grupa pigmenților vegetali — *flavona* — larg răspîndită în natură, în special în plantele superioare. Wawra și Webb în 1942 arată că, de fapt, vitamina *P* este un amestec de două glucozide flavonice, care în soluție se găsesc în stare de echilibru. Cele două glucozide sînt : *hesperidina* și *eriodictina.*



Hesperidina — *Eriodictina*

În coaja de lămîie aceste substanțe se găsesc sub formă combinată cu proteinele și se presupune că participă în această stare la transportul atomilor de hidrogen în sistemele enzimatice.

Vitamina *P* a fost izolată din *eucalipt*, din *frunzele de mei, sparanghel, coacăze, din frunzele de ceai, struguri*, din *mandarinele japoneze* unde se găsesc și alte substanțe înrudite ei *(rutinul, naringina, cvercitina* etc.).

Se consideră că *vitamina P determină o stimulare a biosintezei adrenalinei, prelungind totodată și activitatea adrenalinei.* După Samrai, această vitamină ar forma cu acidul ascorbic un complex rezistent față de agenții oxidanți, preîntîmpinînd astfel degradarea vitaminei *C.* Vitamina *P* nu este toxică pentru organismele animale.

10

LIPIDE. ACIZI GRAȘI. LIPIDE SIMPLE. CERURI. ETOLIDE

Lipidele constituie o grupă de substanțe organice, larg răspîndite în organismele vii, caracterizată prin *eterogenitatea structurii și a proprietăților fizico-chimice*, a reprezentanților care o compun. Insolubile, fără excepție, în apă, însă solubile în solvenți organici (eter, cloroform, benzen, tetraclorură de carbon, toluen, acetonă, alcooli și amestecuri de metanol și cloroform), diferitele tipuri de lipide se deosebesc prin gradul lor de solubilitate (unele sînt ușor solubile în eter etilic însă insolubile în acetonă, altele sînt solubile în benzen însă insolubile în alcool etilic etc.). Această proprietate stă la baza metodelor de separare fracționată a lipidelor.

Din punct de vedere funcțional lipidele pot fi împărțite în două mari categorii :

— *lipide de rezervă, localizate în țesutul adipos*, constituite în principal de triacilgliceroli de proveniență exogenă (alimentară), dar provenite parțial și din glucidele și proteidele prezente în alimente ;

— *lipide citoplasmatice, lipide complexe* care alcătuiesc „elementul constant" (T e r r o i n e) care variază în funcție de natura țesutului. Această împărțire se datorește, pe de o parte, localizării lipidelor în țesutul adipos și în citoplasmă, iar pe de altă parte, observației că în caz de subnutriție (chiar și o perioadă de timp mai îndelungată) sînt consumate numai lipidele de rezervă în timp ce *concentrația lipidelor citoplasmatice rămîne constantă*. Unele lipide, de exemplu, *sfingomielinele, cerebrozidele, etanolaminfosfatidele* și *colesterolul* sînt răspîndite în sistemul nervos, în timp ce ficatul este bogat în *glicerofosfoaminolipide*. În unele infrastructuri celulare lipidele sînt prezente sub forma de complecși lipoproteici (membrana celulară, mitocondrii, lizomi etc.).

Lipidele sînt *constituente importante în alimentația rațională a omului*, nu numai din cauza valorii lor energetice însă și din cauza asocierii lor

cu diferite vitamine şi acizi graşi esenţiali care însoţesc lipidele alimentare, fiind dizolvate în acestea. Lipidele îndeplinesc în corpul uman şi animal şi rolul de *material izolant* localizat în ţesuturile subcutanate sau în jurul diferitelor organe, asigurînd protecţia mecanică. O importanţă desebită o au lipidele mamiferelor care trăiesc în mări, oceane, lacuri şi rîuri (balena, foca, morsa, caşalotul, delfinul, castorii, vidra etc.). Grăsimile conferă dermei elasticitatea necesară şi preîntîmpină uscarea ei, iar la păsări de apă, grăsimile secretate de glanda uropigenă dau penajului proprietatea de a fi impermeabil.

În regnul vegetal, grăsimile se întîlnesc în cantităţi mai reduse cu excepţia seminţelor plantelor oleaginoase care conţin însemnate cantităţi de lipide cunoscute sub denumirea de *uleiuri* (uleiuri de in, cînepă, rapiţă, soia, floarea soarelui, susan, ricin, măsline, nucă de cocos etc.).

Grăsimile sînt utilizate în industrie ca materie primă pentru fabricarea săpunurilor, a uleiurilor medicinale, a uleiurilor industriale, în industria vopselelor, în parfumerie, în diferite preparate alimentare etc.

O clasificare unanim acceptată a lipidelor după criteriul *structurii* lor chimice este în prezent dificilă din cauza eterogenităţii acestei clase de substanţe. B l o o r le clasifică în *lipide simple* în care intră *triacilglicerolii sau trigliceridele* denumite şi *grăsimi neutre şi cerurile, lipidele complexe* în care sînt grupate *fosfolipidele, cerebrozidele şi gangliozidele.*

După cantitatea lor în ţesuturile animale şi vegetale şi după proprietatea de a se dizolva în solvenţi organici lipidele pot fi clasificate în *constituenţi minori (vitaminele liposolubile A, D, E, K, prostaglandinele, carotenii şi carotenoizii)* şi *constituenţi majori (acizii graşi şi derivaţii lor, glicerol esterii, esterii colesterolului, amidele sfingozinei, acizii biliari, hormonii de natură steroidică* ş.a.). Lipidele pot fi clasificate şi după alte criterii, de exemplu, după rolul pe care-l îndeplinesc în organism etc.

10.1 ACIZII GRAŞI

În majoritatea grăsimilor naturale şi a lipidelor alcoolul este întotdeauna acelaşi — *glicerolul*, deosebirile dintre diferite grăsimi rezumîndu-se numai la natura şi structura acizilor carboxilici care sînt esterificaţi cu glicerolul.

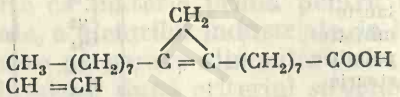
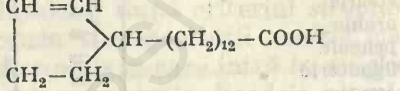
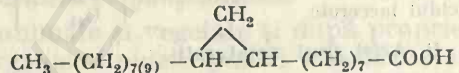
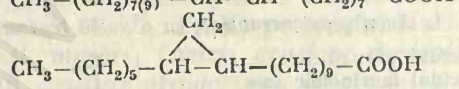
Principalii *acizi graşi* izolaţi din grăsimile naturale sînt acizi monocarboxilici cu catenă normală şi număr par de atomi de carbon, saturaţi şi nesaturaţi (cu una sau mai multe duble legături sau cu triple legături). Destul de rar, în unele grăsimi sau în secreţiile biologice, se întîlnesc şi acizi monocarboxilici cu catenă ramificată, acizi monocarboxilici cu cicluri în catenă, hidroxiacizi sau cetoacizi.

Acizii monocarboxilici frecvent întîlniţi în grăsimile naturale şi în uleiurile extrase din diferite plante fac parte dintr-una din categoriile menţionate în tabelul 10.1.

Răspîndirea acizilor graşi. Termenii inferiori din seria acizilor graşi saturaţi — acidul propionic şi acidul butiric se formează în cursul fermentaţiilor şi nu sînt întîlniţi în compoziţia grăsimilor naturale. *Acidul butiric*

Principalii acizi grași întîlniți în compoziția grăsimilor, uleiurilor, cerurilor și a fosfatidelor și glicolipidelor naturale

Denumirea acidului gras	*Numărul atomilor de C din moleculă*	*Formula structurală*
A. Acizi grași saturați		
Acidul acetic	C_2	CH_3-COOH
Acidul butiric	C_4	$CH_3-(CH_2)_2-COOH$
Acidul caproic	C_6	$CH_3-(CH_2)_4-COOH$
Acidul caprilic	C_8	$CH_3-(CH_2)_6-COOH$
Acidul caprinic	C_{10}	$CH_3-(CH_2)_8-COOH$
Acidul lauric	C_{12}	$CH_3-(CH_2)_{10}-COOH$
Acidul miristic	C_{14}	$CH_3-(CH_2)_{12}-COOH$
Acidul palmitic	C_{16}	$CH_3-(CH_2)_{14}-COOH$
Acidul stearic	C_{18}	$CH_3-(CH_2)_{16}-COOH$
Acidul arahic	C_{20}	$CH_3-(CH_2)_{18}-COOH$
Acidul behenic	C_{22}	$CH_3-(CH_2)_{20}-COOH$
Acidul lignoceric	C_{24}	$CH_3-(CH_2)_{22}-COOH$
Acidul cerotic	C_{26}	$CH_3-(CH_2)_{24}-COOH$
Acidul melisic	C_{28}	$CH_3-(CH_2)_{26}-COOH$
Acidul lacceroic	C_{32}	$CH_3-(CH_2)_{30}-COOH$
B. Acizi grași nesaturați		
1. *Acizi grași nesaturați cu o dublă legătură*		
Acidul obtuzilic	C_{10}	$CH_3-(CH_2)_4-CH=CH-(CH_2)_2-COOH$
Acidul laurinoleic sau dodecenoic	C_{12}	$CH_3-CH_2-CH=CH-(CH_2)_7-COOH$
Acidul miristinoleic sau tetradecenoic	C_{14}	$CH_3-(CH_2)_3-CH=CH-(CH_2)_7-COOH$
Acidul palmitoleic	C_{16}	$CH_3-(CH_2)_5-CH=CH-(CH_2)_7-COOH$
Acidul oleic	C_{18}	$CH_3-(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_7-COOH$
Acidul petroselic	C_{18}	$CH_3-(CH_2)_{10}-CH=CH-(CH_2)_4-COOH$
Acidul gadoleic sau eicosenoic	C_{20}	$CH_3-(CH_2)_9-CH=CH-(CH_2)_7-COOH$
Acidul crucic	C_{22}	$CH_3-(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_{11}-COOH$
Acidul nervonic	C_{24}	$CH_3-(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_{13}-COOH$
Acidul hexacosenoic	C_{26}	$CH_3-(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_{15}-COOH$
2. *Acizi grași nesaturați cu două duble legături în moleculă*		
Acidul sorbic	C_6	$CH_3-CH=CH-CH=CH-COOH$
Acidul linolic	C_{18}	$CH_3-(CH_2)_4-CH=CH-CH_2-CH=CH-(CH_2)_7-COOH$
3. *Acizi grași nesaturați cu trei duble legături în moleculă*		
Acidul linolenic	C_{18}	$CH_3-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=CH-(CH_2)_7-COOH$
Acidul eleostearic	C_{18}	$CH_3-(CH_2)_3-CH=CH-CH=CH-CH=CH-(CH_2)_7-COOH$
4. *Acizi grași nesaturați cu patru duble legături*		
Acidul arachidonic	C_{20}	$CH_3-(CH_2)_4-(CH=CH-CH_2)_4-CH_2-CH_2-COOH$
5. *Acizi grași nesaturați cu cinci duble legături în moleculă*		
Acidul clupanodonic	C_{22}	$CH_3-CH_2-CH=CH-(CH_2)_2-CH=CH-CH_2-CH=CH-(CH_2)_2-CH=CH-(CH_2)_2-CH=CH-(CH_2)_2-COOH$

Denumirea acidului gras	*Numărul atomilor de C din moleculă*	*Formula structurală*
6. *Acizi graşi nesaturaţi cu şase duble legături în moleculă*		
Acidul decosohexaenoic	C_{22}	$CH_3-(CH=CH-CH_2)_6-CH_2-CH_2-COOH$
Acidul nizinic	C_{24}	$CH_3-(CH_2-CH=CH)_4-(CH_2)_2-CH=CH-(CH_2)_2-COOH$
7. *Acizi graşi nesaturaţi cu triple legături în moleculă*		
Acidul taricic	C_{18}	$CH_3-(CH_2)_{10}-C\equiv C-(CH_2)_4-COOH$
8. *Acizi graşi nesaturaţi cu cicluri în catenă*		
Acidul sterculic	C_{19}	
Acidul chaulmoogric	C_{18}	
9. *Acizi graşi saturaţi cu cicluri în catenă*		
Acidul tuberculostearic	C_{21} sau C_{23}	
Acidul lactobacilic	C_{19}	
C. Hidroacizi graşi şi cetoacizi graşi		
Acidul ricinoleic	C_{18}	$CH_3-(CH_2)_5-CHOH-CH_2-CH=CH-(CH_2)_7-COOH$
Acidul licanic	C_{18}	$CH_3-(CH_2)_3-(CH=CH)_3-(CH_2)_4-CO-(CH_2)_2-COOH$

este prezent, dar în stare liberă în untul de vacă. *Acidul izobutiric* se găseşte în stare liberă în unele uleiuri esterice şi în rădăcinile de arnică, iar *acidul izovalerianic* — sub formă liberă sau esterificat în extractele din rădăcinile de *Valeriana officinalis* şi *Angelica archangelica.*

Termenii imediat superiori — *acizii caproic, caprilic şi caprinic* se găsesc mai ales în untul de vacă, oaie şi de capră, în unele grăsimi vegetale, de exemplu, în grăsimile prezente în nuca de cocos, unde însoţeşte principalul acid gras al grăsimilor acesteia — *acidul lauric.* Ultimul se află în stare liberă şi în fructele de dafin — *Laurus nobilis* — de unde a primit şi denumirea, în seminţele diferitelor specii de palmieri unde formează aproximativ 45—50% din totalul acizilor graşi ai grăsimilor însoţit de *acidul miristic* care formează la rîndul lui circa 18—20%. Acidul *lauric* există în cantităţi mici şi la animale în grăsimile din ţesutul adipos, în grăsimile din lapte şi în uleiurile extrase din ficatul de peşte. Aceşti doi acizi graşi sînt folosiţi ca materie primă în industria săpunurilor.

Dintre acizii graşi saturaţi cei mai răspîndiţi sînt acizii palmitic şi stearic care nu lipsesc din nici o grăsime vegetală sau animală. *Acidul palmitic* formează aproximativ 15—50% din totalul acizilor graşi din

grăsimile animale, pînă la 10% în cazul unor uleiuri vegetale, de exemplu în uleiurile extrase din Linaceae, Graminee, Labiate, Compozite, Rozaceae, al grăsimilor unor plante și animale acvatice, 25% din grăsimile din lapte etc., în timp ce *acidul stearic* este prezent într-o proporție mai mare în grăsimile de rezervă ale mamiferelor, în special în grăsimile rumegătoarelor (seul de bou și de oaie) sau ale unor plante tropicale.

Acidul *arachic* și acidul *lignoceric* sînt răspîndiți mai ales în semințele unor leguminoase — *Archis hyprogaea*, precum și în grăsimile de origine animală.

Acidul *behenic* este prezent sub formă de urme în grăsimile de origină animală sau în extractele unor semințe (de exemplu, semințele de muștar). Acest acid formează aproximativ 50% din acizii grași ai cerebrozidelor splenice în boala lui Gaucher (v. cap. 17).

Acidul *cerotic* este răspîndit în stare liberă sau sub formă combinată în *ceara de China*, ceara de albine și în usucul lînei de oaie. Acidul melisic este un component obișnuit al cerii de albine, iar acidul lacceroic se întîlnește în ceara de *Tachardia lacca* și în alte ceruri naturale.

Acidul sorbic, primul termen al seriei acizilor grași cu două duble legături, se găsește în extractele fructelor de *Sorbus aucuparia*.

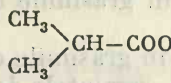
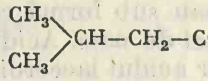
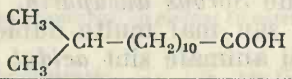
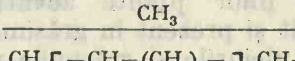
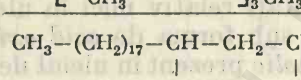
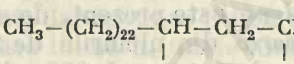
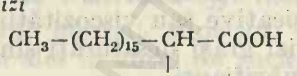
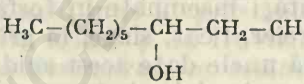
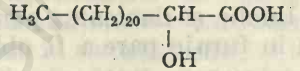
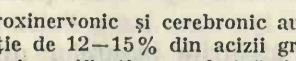
Dintre acizii grași nesaturați cu una sau mai multe duble legături cei mai răspîndiți în grăsimile vegetale și animale sînt *acidul oleic* care se găsește în grăsimile din fructele oleaginoaselor (80%), în uleiurile de rozacee, graminee, labiate, compozite (30—60%), uleiul de in (15—25%), grăsimile animale (40—60%), grăsimile unor plante acvatice etc.; *acidul palmitoleic* este extrem de răspîndit și prezent în grăsimea de om în proporție de aproximativ 5—6%, în uleiurile și grăsimile plantelor, la animalele acvatice unde proporția lui este mult mai mare (15—20%), în lapte; *acidul erucic* se găsește în cantități relativ mici în uleiurile de rapiță și de muștar, iar acidul *nervonic*, sub forma de *acid oxinervonic*, intră în structura *cerebrozidelor*; *acidul linolic* prezent în uleiul de măsline, de in (25—30%) și în proporție mult mai mică răspîndit în grăsimile de rezervă ale animalelor terestre; *acidul linolenic* este prezent, de asemenea, în uleiurile de in (40—50%), *acidul eleostearic* din uleiurile de tung, izolate din *Aleurites montana* și *A. fordii*, unde formează 80% din totalul acizilor grași și *acidul ricinoleic* prezent în uleiul de ricin în proporție de 85—90%. Datorită proprietăților lor sicative sau viscozității lor mari uleiurile care conțin mari cantități de acizi grași nesaturați sînt folosite în industria de lacuri și vopsele sau ca lubrifianți.

Acidul arahidonic se găsește în cantități însemnate în fosfatidele de origine animală (aproximativ 20%) în creier, ficat, sînge, în grăsimile de rezervă ale bovinelor și porcinelor). După unele date acest acid gras este absent în plante, ceea ce înseamnă că animalele ierbivore au capacitatea de a-l sintetiza, probabil, din acizii linolic și linolenic; pentru celelalte animale prezența lui în alimente sau în furaje pare a fi obligatorie.

Acidul docosohexanoic a fost izolat în cantități relativ mari (5—10%) din grăsimea mamiferelor marine și a peștilor de apă dulce și marini (din grăsimea sardelelor japoneze).

Acidul chaulmoogric este prezent în uleiurile plantelor din familia *Flacourtiaceae* care trăiesc în Asia de sud și în Africa tropicală; *acidul*

*Acizii graşi cu catenă ramificată şi hidroxiacizi**

Denumirea acidului	*Formula structurală*	*Răspîndirea în natură***
I. *Acizi graşi cu catenă ramificată*		
Acidul *izo*butiric		Produs intermediar al metabolismului valinei şi degradării enzimatice a proteinelor. Se găseşte în stare liberă în *Ceratonia lingua*, iar sub formă de ester şi în fecale.
Acidul *izo*valerianic		Produsul intermediar al metabolismului leucinei şi degradării microbiene a proteinelor. Se găseşte în stare liberă în uleiurile volatile, frunzele de tutun şi rădăcinile de valeriană.
Acidul *izo*miristic		Se găseşte sub formă esterificată în lanolină
Acidul tuberculostearic		În stare liberă în lipidele bacilului tuberculozei şi în *Mycobacterium leprae*.
Acidul fitanic		Se găseşte în urme în grăsimile animale, în serul sanguin şi în untul de vacă.
Acidul micolipenic		Acid în stare liberă în bacilul tuberculozei
Acidul micoceranic		Se găseşte împreună cu acidul micolipenic şi tuberculostearic în bacilul tuberculozei.
II. *Hidroxiacizi*		
Acid α-hidroxistearic		Se găseşte în structura cerebrozidelor din creierul omului sănătos.
Acid ricinoleic		Se întîlneşte sub formă de triacilgliceroli în uleiul de ricin.
Acid 2-hidroxitricazonoic		Constituent al cerobrozidelor din creierul omului sănătos. Relativ răspîndit: formează 7% din acizii graşi totali.

* Acizii hidroxinervonic şi cerebronic au fost descrişi în capitolul 11, la cerebrozide, în care se găsesc în proporţie de 12—15% din acizii graşi constituenţi ai acestora.

** Acizii graşi ramificaţi care derivă de la aminoacizi şi din metabolismul proteinelor sînt descrişi în capitolele respective.

licanic se găsește în proporție de 75—80% în uleiurile de *Licania rigida* și *Parinarium Sherbroense*, plante care cresc în zonele tropicale ale Americii și Africii, iar *acidul taricic* formează 90% din compoziția uleiurilor extrase din semințele plantei *Picramia Sow* din Guatemala.

Numeroși acizi grași saturați (palmitic, stearic, butiric etc.) și nesaturați (linoleic, linolenic, arachidonic ș.a.) se întîlnesc în structura *fosfatidelor*; hidroxiacizii (α-hidroxistearic, 2-hidroxitricozanoic, cerebronic, 2-hidroxinervonic) sînt constituenți ai *cerebrozinelor*. Principalii acizi grași cu catenă ramificată și hidroxiacizii naturali sînt prezentați în tabelul 10.2.

Acizii grași nesaturați cu două sau mai multe duble legături în moleculă îndeplinesc un rol extrem de important în nutriția animală, deoarece unii dintre ei nu sînt sintetizați de organismele animale în cantitate suficientă pentru acoperirea necesităților. Cei mai importanți din acest punct de vedere sînt acizii *cis-cis-linoleic* și *arachidonic*, denumiți și *acizi grași esențiali*, deoarece participă la formarea membranelor celulare, în metabolismul mitocondrial, intră în structura fosfolipidelor și constituie precursori ai *prostaglandinelor*. Acizii grași esențiali sînt cunoscuți și sub denumirea de *vitamina F*; stimulează procesele de creștere și carența lor determină oprirea creșterii organismului animal (șobolan) și apariția de eczeme.

10.1.1 Proprietăți fizico-chimice ale acizilor grași

Izomeria acizilor grași poate fi *izomerie de structură* și *stereoizomerie* sau izomerie spațială.

Izomeria de structură se poate referi la :

Structura lanțului atomilor de carbon,

$CH_3-CH_2-CH_2-COOH$ — *Acid butiric*

$$\begin{matrix} CH_3 \\ \diagdown \\ \quad CH-COOH \\ \diagup \\ CH_3 \end{matrix}$$

Acid izobutiric

Izomeria de poziție a dublei legături în moleculă,

$CH_3-(CH_2)_7-\overset{10}{CH}=\overset{9}{CH}-(CH_2)_7-COOH$ — *Acid oleic*

$CH_3-(CH_2)_{10}-\overset{7}{CH}=\overset{6}{CH}-(CH_2)_4-COOH$ — *Acid petroselic*

$CH_3-(CH_2)_5-\overset{12}{CH}=\overset{11}{CH}-(CH_2)_9-COOH$ — *Acid vaccenic*

Acești trei izomeri de poziție ai acidului oleic au fost identificați în structura grăsimilor naturale. Din produsele naturale și pe cale de sinteză au fost obținuți 14 acizi izooleinici care se deosebesc între ei prin punctele de topire și prin formele de cristalizare (tabelul 10.3).

Temperatura de topire a diferiților izomeri cis și trans ai aicizilor izooleici

Poziția dublei legături	*Forma izomeră*	*Temperatura de topire, g°C*	*Observații*
2,3	Cis	59	
3,4	Cis	56—57	
4,5	Cis	52—53	
5,6	Trans	47,5	
6,7	Trans	53	
6,7	Cis	30	
7,8	Trans	45,5	
8,9	Trans	53	
9,10	Trans	43,7	
9,10	Cis	13,4 și 16,3	
10,11	Trans	42	Cele două forme prezintă structuri cristaline diferite.
11,12	Trans	39	
12,13	Trans	39,7—40,1	Această formă este de fapt acidul vaccenic.
12,13	Cis	9,8—10,4	

Izomeria de poziție a diferitelor grupări funcționale,

$CH_3-CH_2-CHOH-COOH$ — *Acidul α-hidroxibutiric*

$CH_3-CHOH-CH_2-COOH$ — *Acidul β-hidroxibutiric*

izomerii de poziție se întîlnesc și la acizii grași cu trei duble legături sau trienici, de exemplu,

$$CH_3-CH_2-\overset{15}{CH}=CH-CH_2-\overset{12}{CH}=CH-CH_2-\overset{9}{CH}=CH-(CH_2)_7-COOH$$

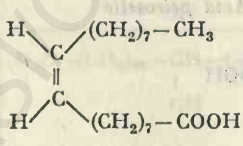
Acidul linolenic

$$CH_3-(CH_2)_3-\overset{13}{CH}=CH-\overset{11}{CH}=CH-\overset{9}{CH}=CH-(CH_2)_7-COOH$$

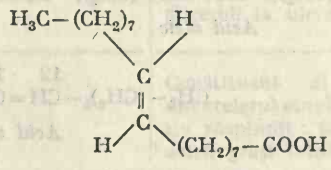
Acidul eleostearic

și din cei opt izomeri, teoretic posibili, în structura grăsimilor se întîlnesc numai cei menționați mai sus.

Stereoizomeria poate fi la rîndul ei de două feluri : *izomeria geometrică (cis-trans)* întîlnită la acizii grași nesaturați liniari, și *izomeria optică* datorată prezenței atomilor de carbon asimetrici.



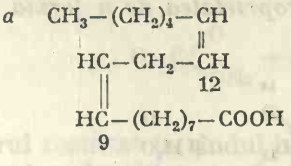
Acid oleic (*cis*)



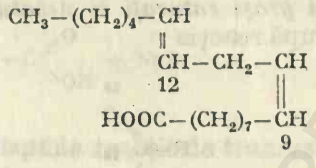
Acid elaidic (*trans*)

Acidul linoleic este prezent în grăsimi sub forma a doi izomeri geometrici, dintre care unul poartă denumirea de *acid α-linoleic*, iar altul de *acid*

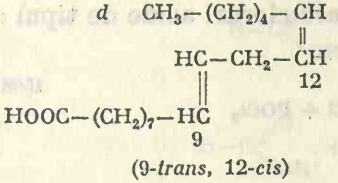
β-*linoleic*. Teoretic acest acid poate exista sub forma a 4 izomeri geometrici:



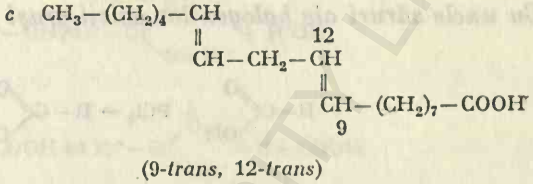
(9-*cis*, 12-*cis*)



(9-*cis*, 12-*trans*)



(9-*trans*, 12-*cis*)



(9-*trans*, 12-*trans*)

Acidul α-linoleic este de fapt denumirea izomerului 9-*cis*, 12-*cis*, iar structura acidului β-linoleic nu este încă precizată.

Este important de menționat faptul că acizii etenici sau acizii grași cu o singură dublă legătură în moleculă sînt prezenți în grăsimile naturale numai sub formă *cis*. Excepție face numai acidul vaccenic care se găsește sub formă *trans*.

Izomeria optică este mai puțin răspîndită la acizii grași și se întîlnește la acizii chaulmoogric, hidnocarpic și ricinoleic. Ultimul are spre exemplu doi izomeri optici deoarece prezintă un atom de carbon asimetric (*C):

$$CH_3-(CH_2)_5-{}^*CHOH-CH_2-CH=CH-(CH_2)_7-COOH.$$

Polimorfismul acizilor grași și derivaților lor. Acizii grași și compușii lor cu unele substanțe pot exista, în stare solidă, în mai multe forme cristaline polimorfe care se deosebesc între ele prin forma cristalelor, energia liberă, temperatura de topire, greutate specifică și alte constante fizico-chimice.

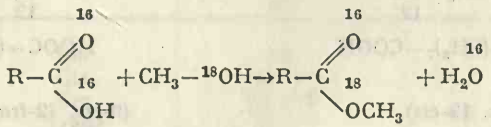
Fenomenul de polimorfism este important pentru industria săpunurilor, cu atît mai mult cu cît trigliceridele utilizate în procesul de saponificare formează mai multe forme polimorfe. De exemplu, trilaurina și tristearina există în trei forme polimorfe în timp ce oleodilaurina și monostearodioleina au patru și respectiv trei forme polimorfe.

Formele polimorfe ale acizilor grași și gliceridelor pot fi studiate cu metode roentgenoscopice, vizuale (microscopul polarizant), termice și dilatometrice.

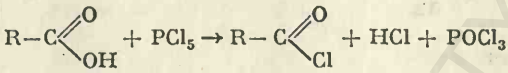
Proprietăți chimice. Acizii grași au proprietatea de a forma esteri cu alcoolii, anhidridele, reacționează cu metalele formînd săpunuri etc. Acizii grași nesaturați adiționează halogenii și tiocianatul liber la nivelul dublei (dublelor) legături sau reacționînd cu hipohalogenuri adiționează atît halogenul cît și gruparea hidroxil. În prezența ozonului formează ozonide care se descompun în soluții apoase și în atmosferă de hidrogen.

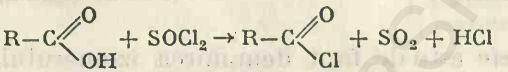
În continuare sînt descrise principalele tipuri de reacţii chimice date de acizii graşi.

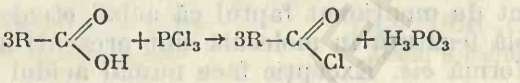
Acizii graşi saturaţi şi nesaturaţi au proprietatea de a forma esteri cu alcoolii după reacţia :



Cu unele săruri ale halogenilor acizii graşi formează cloruri acide de tipul :

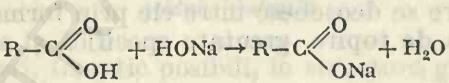


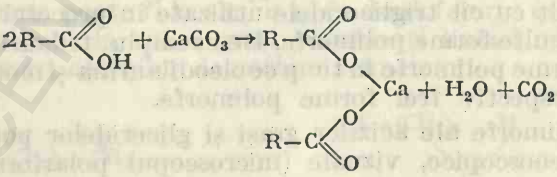




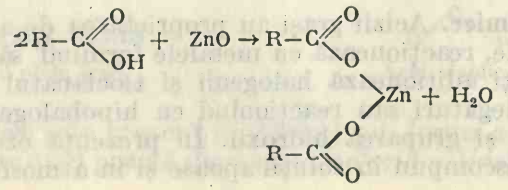
care sînt utilizate în practica preparării pe cale sintetică a esterilor şi a gliceridelor.

Acizii graşi reacţionează cu metalele formînd săruri cunoscute sub numele de *săpunuri*, de exemplu, săruri de Na, K, Ca, Pb, Mg, Ba ş.a. Sărurile de Na şi K sînt solubile în apă în timp ce sărurile acizilor graşi cu celelalte metale sînt în general insolubile. Soluţiile apoase ale săpunurilor solubile dau spume caracteristice şi sînt utilizate în scopuri higienice. Reacţiile de formare a săpunurilor sînt de tipul :



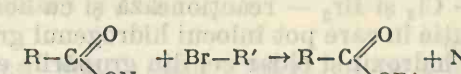


sau

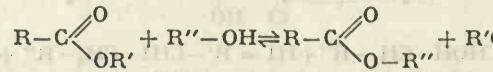


BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

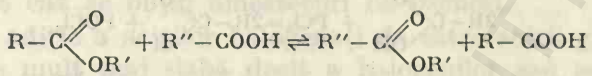
Sărurile acizilor graşi cu metalele sînt folosite practic şi în reacţiile de esterificare în prezenţa derivaţilor halogenaţi.



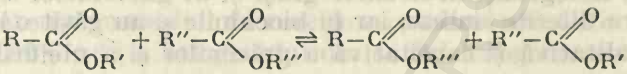
Esterul rezultat la rîndul lui este utilizat în reacţii de transesterificare în prezenţa alcoolilor conform ecuaţiei :



sau

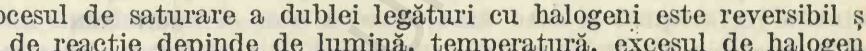


sau



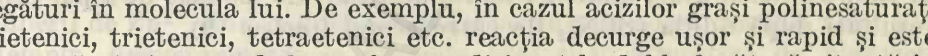
Acizii graşi nesaturaţi adiţionează halogenii la nivelul dublei legături formînd halogenoderivaţi

Procesul de saturare a dublei legături cu halogeni este reversibil şi viteza de reacţie depinde de lumină, temperatură, excesul de halogen, natura solventului în care este dizolvat acidul gras şi de poziţia dublelor legături în molecula lui. De exemplu, în cazul acizilor graşi polinesaturaţi dietenici, trietenici, tetraetenici etc. reacţia decurge uşor şi rapid şi este treptată : la început halogenul este adiţionat la dubla legătură situată în poziţia cea mai depărtată de gruparea carboxil, şi apoi la dubla legătură vecină acesteia ş.a.m.d. (1—3) :



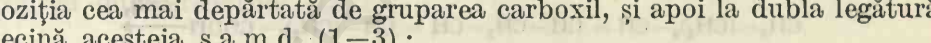
(1)

Acid 15,16-dibromlinolenic



(2)

Acid 12, 13, 15, 16,-tetrabromlinolenic



(3)

Acid 9, 10, 12, 13, 15, 16-hexabromlinolenic

Reacţia de adiţie decurge identic dacă în locul Br_2 se foloseşte BrI sau ClI, deoarece Cl_2 şi Br_2 sînt la fel de reactivi în cazul grăsimilor şi acizilor

grași liberi în timp ce I_2 este mai pasiv și nu saturează toate dublele legături din moleculele acizilor grași nesaturați.

Cei doi halogeni — Cl_2 și Br_2 — reacționează și cu acizii grași saturați în reacțiile de substituție în care pot înlocui hidrogenul grupărilor metilen, hidrogenul grupărilor hidroxil și chiar cel din grupările carboxil (reacțiile 4 — 7) :

$$R'-CH_2-CH_2-R''+Cl_2 = R'-CHCl-CH_2-R''+HCl \quad (4)$$

$$3R'-CHOH-CH_2-R''+PCl_3 = 3R'-CHCl-CH_2-R'' + H_3PO_3 \quad (5)$$

$$R'-CHOH-CH_2-R''+HI = R'-CHI-CH_2-R'' + H_2O \quad (6)$$

$$2R-C(=O)-OH + PCl_5 = 2R-C(=O)-Cl + POCl_3 \quad (7)$$

Derivații halogenați ai acizilor grași și ai gliceridelor sînt folosiți în chimie pentru diferite sinteze, iar în biochimie și-au găsit o largă utilizare în analiza calitativă și cantitativă a grăsimilor și a uleiurilor vegetale și animale.

Acizii grași nesaturați adiționează la nivelul dublei legături tiocianatul liber $(SCN)_2$. Acizii monoetenici, de exemplu, acidul oleic reacționează după reacția (8) :

$$CH_3-(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_7-COOH+(SCN)_2 = CH_3-(CH_2)_7-\underset{SCN}{CH}-\underset{SCN}{CH}-(CH_2)_7-COOH \quad (8)$$

în timp ce acizii grași dietenici dau amestecuri de izomeri de tipul celor rezultați după adiția $(SCN)_2$ de către *acidul linoleic* (9).

$$CH_3-(CH_2)_4-CH=CH-CH_2-CH=CH-(CH_2)_7-COOH \xrightarrow{(SCN)_2}$$

$$\longrightarrow \begin{cases} CH_3-(CH_2)_4-\underset{SCN}{CH}-\underset{SCN}{CH}-CH_2-CH=CH-(CH_2)_7-COOH \\ CH_3-(CH_2)_4-CH=CH-CH_2-\underset{SCN}{CH}-\underset{SCN}{CH}-(CH_2)_7-COOH \end{cases}$$

iar în acizii grași trienici, de exemplu, acidul linolenic sînt saturate numai două duble legături după reacția (10) :

$$CH_3-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=CH-(CH_2)_7-COOH+(SCN)_2$$

$$\rightarrow CH_3-CH_2-\underset{SCN}{CH}-\underset{SCN}{CH}-CH_2-CH=CH-CH_2-\underset{SCN}{CH}-\underset{SCN}{CH}-(CH_2)_7-COOH \quad (10)$$

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITARA

Acizii graşi nesaturaţi reacţionează şi cu HOCl, HOBr, HOI *adiţionînd la nivelul dublei legături atît halogenul cît şi gruparea hidroxil* (reacţia 11), dînd halogenooxiacizi :

$$CH_3-(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_7-COOH + HOCl = CH_3(CH_2)_7-\overset{10}{\underset{Cl}{CH}}-\overset{9}{\underset{OH}{CH}}-(CH_2)_7-COOH +$$

$$+ CH_3-(CH_2)_7-\overset{10}{\underset{OH}{CH}}-\overset{9}{\underset{Cl}{CH}}-(CH_2)_7-COOH \qquad (11)$$

Poziţia în care au fost adiţionaţi halogenul şi hidroxilul poate fi diferită şi în acest caz se obţin amestecuri de izomeri.

Reacţia de adiţie a acizilor halogenaţi de către acizii graşi mono- şi polietenici este mult mai slabă decît a halogenilor sau acizilor HOCl, HOBr, HOI şi este în funcţie de numărul dublelor legături, de poziţia acestora şi prezenţa în mediul de reacţie a catalizatorilor. La temperaturi mai mari de 100°C adiţia halogenului din acidul halogenat este însoţită şi de adiţia hidrogenului, obţinîndu-se un acid gras saturat şi halogenat, conform reacţiei (12) :

$$CH_3(CH_2)_{14}-CH=CH-COOH + HBr = CH_3(CH_2)_{14}-CHBr-CH_2-COOH \qquad (12)$$

Oxidarea acizilor graşi în prezenţa ozonului are loc în soluţii de acid acetic sau cloroformice în care se barbotează ozon la temperaturi scăzute (0°C) ; *ozonidele* rezultate sînt descompuse în atmosferă de hidrogen şi în prezenţa apei cînd se obţin acizi şi aldehide, în medii de HCl şi în prezenţa pulberii de Zn^{2+} cînd rezultă aldehide, iar în acid acetic rezultă acizi. De exemplu, descompunerea în prezenţa apei şi în atmosferă de hidrogen decurge după reacţiile (13) :

$$CH_3-(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_7-COOH + O_3 \rightarrow CH_3-(CH_2)_7-\overset{O}{\underset{O-O}{CH-CH}}-(CH_2)_7-COOH \rightarrow$$

$$\rightarrow CH_3-(CH_2)_7-COOH + \overset{O}{\underset{H}{}}\!\!>\!C-(CH_2)_7-COOH$$

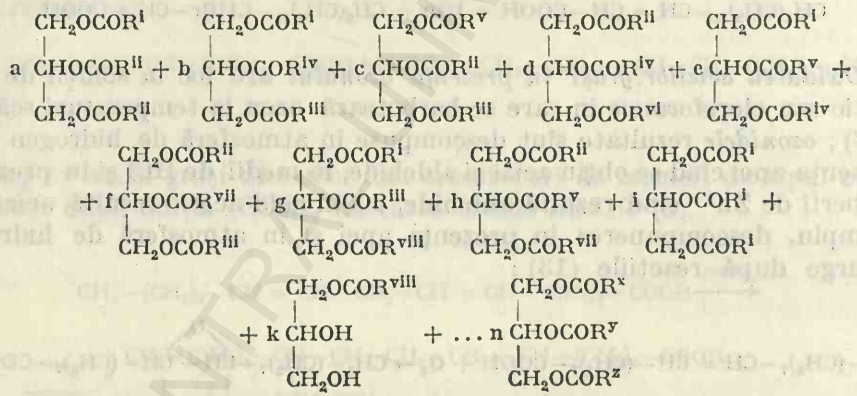
$$\rightarrow CH_3-(CH_2)_7-\overset{O}{\underset{H}{C}} + HOOC-(CH_2)_7-COOH \qquad (13)$$

Acizii graşi pot fi oxidaţi şi cu permanganat de potasiu, acid periodic, tetraacetat de plumb, peroxiacizi etc., reacţiile de oxidare utilizîndu-se în scopul stabilirii structurii lor chimice.

10.2 ACILGLICEROLII SAU GRĂSIMILE NEUTRE*

Acilglicerolii, grăsimile neutre sau gliceridele sînt răspîndite în uleiurile vegetale, în ţesuturile adipoase ale animalelor şi omului, precum şi în unele organe de depozitare, întîlnite la plante. Acilglicerolii sînt esteri ai glicerolului cu unul, două sau trei resturi de acizi graşi, rezultînd, respectiv, *monoacilgliceroli*, *diacilgliceroli* şi *triacilgliceroli* sau trigliceride. Glicerolul poate fi esterificat cu trei molecule ale unuia şi aceluiaşi acid gras (exemplu, trioleilglicerolul lichid la temperatura obişnuită, tripalmitilglicerolul şi tristearilglicerolul-solide) sau este esterificat cu resturi de diferiţi acizi graşi, exemplu, α,α′-distearil-β-palmitilglicerolul, α,β-distearil-α′-palmitil-glicerolul, α-oleil-β-palmitil-α′-stearilglicerolul, α,α′-palmitil-β-stearilglicerolul etc.** În unele cazuri glicerolul este esterificat cu un singur rest de acid gras, de exemplu, α-palmitilglicerolul din pancreasul de bovine. Dintre acizii graşi nesaturaţi în compoziţia acilglicerolilor au fost identificaţi în cantităţi mai mari acizii *oleic*, *linolic*, *linolenic* şi *arahidonic*, care spre deosebire de alţi acizi graşi nu pot fi sintetizaţi de organismul uman şi de animale.

Grăsimile neutre naturale reprezintă un amestec de trigliceride, digliceride şi monogliceride, în care grupările hidroxil ale glicerolului sînt esterificate cu acizi graşi saturaţi şi nesaturaţi, iar felul acestora este diferit în funcţie de sursa grăsimilor neutre şi variază între patru şi opt. Trigliceridele care conţin resturile unui singur acid gras, precum şi monogliceridele se găsesc în grăsimile neutre naturale în proporţii mult mai mici. Compoziţia unei grăsimi neutre naturale poate fi reprezentată schematic astfel :



în care a — n reprezintă numărul moleculelor trigliceridei respective, iar indicii x, y şi z natura diferită a radicalilor R într-o trigliceridă. Cantitatea x a trigliceridelor diferite ca structură, care se pot forma în prezenţa a n acizi graşi diferiţi, este dată de relaţia $x = n^3 + n^2 / 2$. Dacă n este egal cu 5 numărul trigliceridelor posibile va fi 75 ; $n = 8$ va duce la formarea a 288 de trigliceride diferite etc.

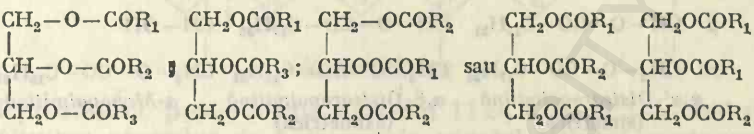
---

* Denumirile vechi de grăsimi sau de trigliceride au fost înlocuite de IUB şi IUPAC cu termenul generic de *acilgliceroli*. În textul de faţă denumirile sînt utilizate în paralel şi au aceeaşi semnificaţie.

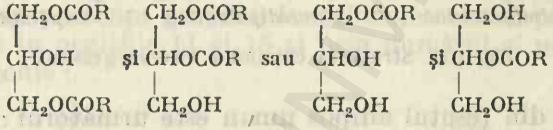
** În 1979, cînd această lucrare se afla sub tipar, IUB şi IUPAC au recomandat pentru resturile acizilor graşi esterificaţi folosirea terminaţiei-*oil*, de exemplu, α′, α′- palmitoil-β-stearoilglicerolul ş.a.m.d.

În cazul unor uleiuri naturale care conţin mari cantităţi ale unui acid gras, de exemplu al uleiului de măsline care conţine 80% acid oleic, a uleiului de ricin (80% acid ricinoleic) sau a uleiului de tung (80% acid α-eleostearic) predomină trigliceridele pe care aceşti acizi le formează cu glicerolul-trioleina, triricinoleină şi trieleostearina. În alte situaţii de exemplu, a uleiului de cocos predomină caprilolauromiristina (50—60%) şi miristodilaurina (15—20%) în timp ce laurodimiristina, palmitinodimiristina şi stearodipalmitina sînt prezente numai sub formă de urme. Grăsimile animale de tipul grăsimii de porc conţin în cantităţi mari α-palmitinodioleina (82%) şi în cantităţi mult mai mici β-oleopalmitina stearina (11%) şi α-oleodistearina (2%), alte trigliceride fiind prezente în urme.

Digliceridele şi trigliceridele prezintă fenomenul de izomerie condiţionat de prezenţa în molecula lor a resturilor de acizi graşi diferiţi:



Trigliceridele în care grupările hidroxil ale glicerolului sînt esterificate cu acelaşi acid gras (trioleina, tristearina, tripalmitina etc.) nu prezintă fenomenul de izomerie, în timp ce monogliceridele şi digliceridele prezintă izomerie de poziţie:



Grăsimile neutre formează emulsii în apă care pot fi stabilizate cu ajutorul agenţilor emulsionanţi (săruri biliare, proteine etc.). În prezenţa oxigenului din aer şi a ozonului, grăsimile neutre se descompun prin oxidarea acizilor graşi cu formare de oxiacizi, aldehide, cetone şi acizi cu masă moleculară mică şi cu un gust neplăcut şi iute. Descompunerea gliceridelor poate avea loc şi sub acţiunea altor agenţi chimici, fotochimici sau sub influenţa microorganismelor. Iniţial, se pare că se formează peroxizi ai acizilor graşi capabili să treacă în compuşi nesaturaţi care la rîndul lor pot fixa din nou oxigenul. Procesul cunoscut sub denumirea de *rîncezirea grăsimilor* modifică proprietăţile fizice şi chimice ale grăsimilor precum şi proprietăţile lor organoleptice, făcîndu-le neutilizabile în alimentaţie. Grăsimile neutre pot fi hidrolizate cu formare de glicerol şi acizi graşi. Hidroliza grăsimilor poartă denumirea de *saponificare* şi ea se poate realiza în prezenţa alcaliilor, a acizilor minerali sau a vaporilor supraîncălziţi.

În prezenţa alcaliilor, acizii graşi care rezultă sînt neutralizaţi cu formare de săruri, care în cazul acizilor graşi superiori poartă denumirea de *săpunuri* (săruri de sodiu solide, solubile în apă şi săruri de potasiu lichide şi de asemenea solubile în apă). Sărurile acizilor graşi cu metalele grele şi alcalino-pămîntoase sînt insolubile.

Uleiurile pot fi transformate în grăsimi solide prin hidrogenare, însă în acest caz vitaminele liposolubile, care sînt prezente eventual în unele uleiuri, sînt distruse din care cauză pentru îmbunătăţirea calităţilor nutritive este nevoie de îmbogăţire artificială în vitamine liposolubile.

Prin compoziţia triacilglicerolilor din care sînt constituite, grăsimile naturale sînt extrem de heterogene. Din punct de vedere al compoziţiei în acizi graşi grăsimile naturale din ţesutul adipos al mamiferelor terestre se caracterizează prin prezenţa acizilor oleic, palmitic şi stearic. Laptele mamiferelor conţine însă mari cantităţi de acizi graşi inferiori cu C_4 pînă la C_{12}. Raportul procentual între principalii acizi graşi care intră în compo-

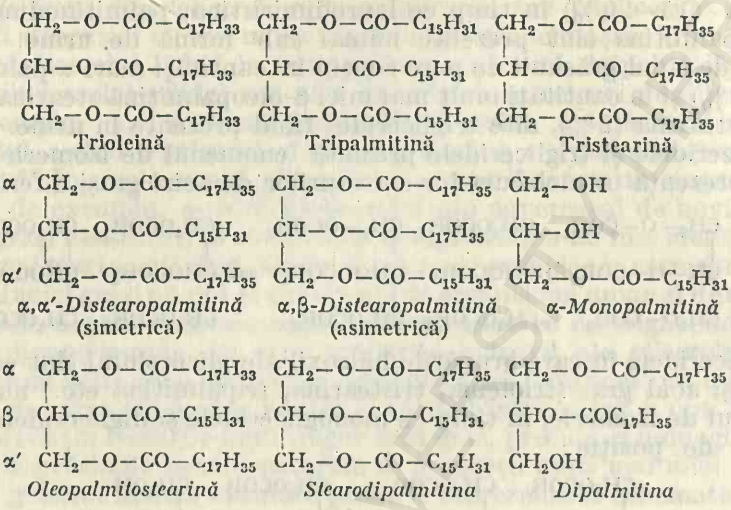


Fig. 10.1 Structura chimică a citorva grăsimi

ziţia grăsimilor din ţesutul adipos uman este următorul : acid oleic—45, palmitic—25, linoleic—10, palmitiloleic—7, stearic—6. În grăsimile animalelor acvatice acidul palmitic esterificat, formează aproximativ 10—18% din totalul acizilor graşi, restul fiind reprezentat prin acizi graşi superiori nesaturaţi cu un număr de atomi de carbon care variază de la C_{16} pînă la C_{22}.

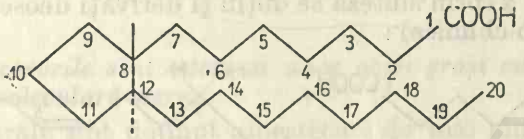
Grăsimile de rezervă se acumulează în ţesutul subcutanat în muşchi, în vecinătatea diferitelor organe interne (inimă, ovare, rinichi, intestine ş.a.) pe care le protejează într-o oarecare măsură contra şocurilor mecanice. Grăsimile de rezervă pot fi de origine exogenă alimentară, sau endogenă, rezultate din procesele de biosinteză realizate de organism. Ele constituie în primul rînd o importantă rezervă de energie, degradarea lor fiind însoţită de eliberare de energie mai mare decît în cazul zaharurilor şi proteinelor (v. cap. 14, 20). Pe de altă parte, la animalele cu sînge cald grăsimile protejează organismul contra pierderilor de căldură îndeplinind un important rol de protecţie.

10.3 PROSTAGLANDINE

Prostaglandinele alcătuiesc o grupă de substanţe *răspîndite în numeroase ţesuturi şi lichide biologice : ficat, timus, pancreas, uter, creier, rinichi, plasma seminală animală şi umană, în sîngele din cordonul ombilical, în sîngele*

de menstră, în organele tractului gastro-intestinal, iris, lichidul amniotic etc. Principala lor acțiune fiziologică constă în contractarea sau relaxarea musculaturii netede a intestinului și a uterului (G o l d b l a t t, 1935, von E u l e r, 1937). Prostaglandinele sînt sintetizate, în principal, în veziculele seminale din acizi grași superiori esențiali.

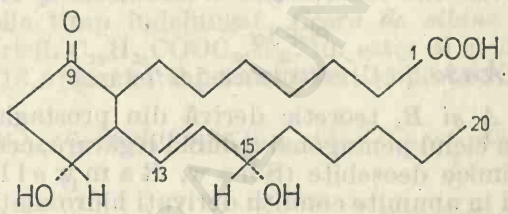
Structura chimică și proprietăți fizico-chimice ale prostaglandinelor. *Prostaglandinele sînt acizi grași superiori nesaturați hidroxilați cu 20 atomi de carbon și un ciclu pentagonal.* Din punct de vedere al structurii chimice prostaglandinele sînt derivați ai *acidului prostanoic*



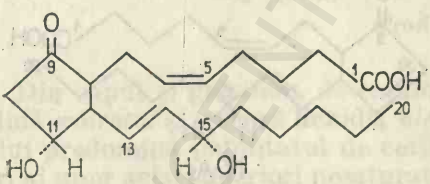
Acid prostanoic

Acidul prostanoic poate forma derivați 11α-, 11β- și 15α- hidroxilați, prin substituirea atomilor de hidrogen la nivelul ciclului pentagonal sau în catenă. Din țesuturile, organele și lichidele biologice, B e r g s t r ö m și S j o v a l, (1960) și B e r g s t r ö m, (1967), au obținut preparate de prostaglandine pe care le-au denumit *prostaglandinele A, B, E* și *F**.

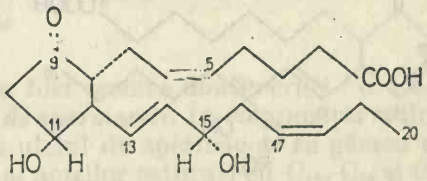
Prostaglandinele E în număr de trei alcătuiesc o grupă de substanțe caracterizate prin prezența grupării funcționale ceto în poziția 9, a două grupări hidroxil în pozițiile 11 și 15 și prin numărul și pozițiile dublelor legături în molecule :



Acid (-) 11α,15(S)-dihidroxi-9-ceto-13-trans-prostanoic sau PGE_1



Acid 11α,15(S)-dihidroxi-9-ceto-5-cis, 13-trans-prostadienoic sau PGE_2

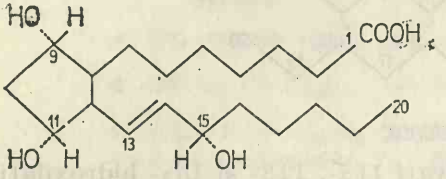


Acid 11α,15(S)-dihidroxi-9-ceto-5-cis, 13,-trans,17-cis-prostatrienoic sau PGE_3

* Există cîteva propuneri pentru o nomenclatură unitară a prostaglandinelor (N u g t e r e n și a l ț i i, 1966, B e r g s t r ö m și c o l a b., 1963). În lucrare vor fi descrise numai principalele prostaglandine, ținîndu-se seama de raporturile structurale dintre ele. În literatura din ultimii ani sînt descriși peste 600 compuși înrudiți structural cu prostaglandinele și reprezentînd produși ai metabolismului lor intermediar sau produși de sinteză.

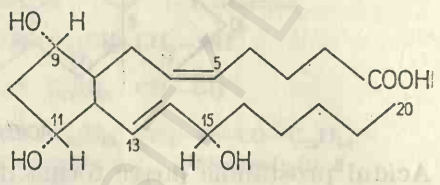
Prostaglandinele E au fost identificate și extrase din numeroase țesuturi și fluide biologice : *glanda veziculară și pulmonul de ovine, tiroida de bovine, rinichiul de porc, plasma seminală umană, sîngele de menstră de femeie.* Prostaglandinele *E* au acțiune inhibitorie asupra miometrului uman (S é z i l l e, 1972).

Prostaglandinele F pot fi considerate ca derivînd din prostaglandinele *E*, deoarece se obțin pe cale de sinteză prin reducerea acestora cu borohidrură de sodiu. În natură, aproape în toate organele animale și umane studiate (B e r g s t r ö m, S a m u e l s o n, 1965) se găsesc numai sub forma derivaților α (prin sinteză se obțin și derivați deosebiți între ei prin proprietățile fizico-chimice) :



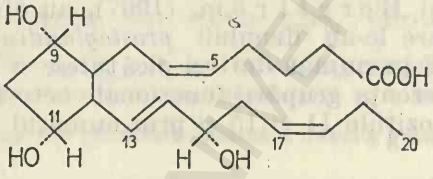
PGF1α

Acid 9α,11α,15-trihidroxiprost-13-enoic



PGF2α

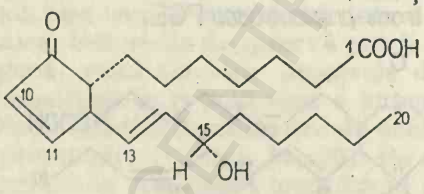
Acid 9α,11α,15-trihidroxiprost-5,13-dienoic



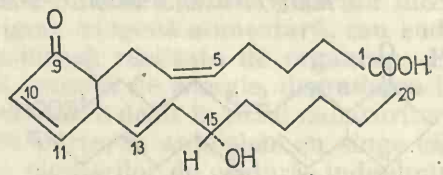
PGF3α

Acid 9α,11α,15-trihidroxiprost-5,13,17-trienoic

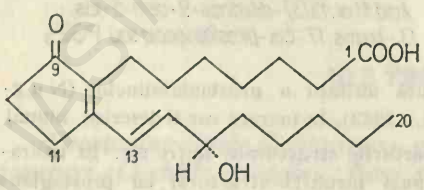
Prostaglandinele A și B, teoretic derivă din prostaglandinele PGE_1 și PGE_2 și prezintă în ciclul pentagonal o dublă legătură, ceea ce le conferă proprietăți fizico-chimice deosebite (S h a w, R a m w e l l, 1969 ; H i n m a n, 1972) formînd în anumite condiții derivați hidroxilați la C_{15}, care se întîlnesc în stare naturală în țesuturile animale.



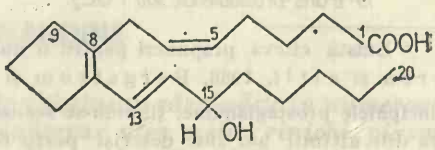
PGA_1



PGA_2



PGB_1



PGB_2

Toate prostaglandinele sînt substanţe hidrofile, uşor solubile în soluţii apoase de acetonă, etanol, metanol sau în amestecuri de metanol-cloroform şi sensibile faţă de acţiunea alcaliilor care le hidrolizează cu pierderea activităţii lor biologice. Biosinteza, degradare şi rolul biologic al prostagandinelor sînt descrise în capitolul 17.

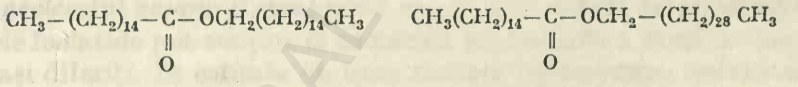
10.4 CERIDE (CERURI)

Ceridele sau cerurile sînt esteri ai unor acizi graşi cu alcooli superiori aciclici cu masă moleculară mare.

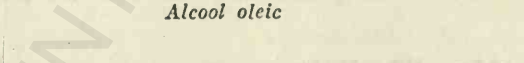
Cerurile naturale sînt de fapt amestecuri de mai mulţi esteri, în care de obicei unul predomină, cu cantităţi variabile de acizi liberi şi alcani.

Cerurile sînt larg răspîndite în lumea vegetală unde fructele, lujerii, tulpinile şi frunzele sînt acoperite de un strat subţire de protecţie constituit din ceruri. Stratul de ceară de pe fructe are rolul de a le proteja împotriva umidităţii excesive, de a preîntîmpina pierderea apei şi uscarea, precum şi atacul microbian. Ceridele animale sînt secretate de glandele cerifere ale insectelor, glandele uropigee ale păsărilor şi de glandele sebacee ale mamiferelor. La caşalot în cutia craniană se găsesc importante cantităţi de *spermanţet*, o ceară lichidă şi *walrat*, ceară solidă.

Ceridele sînt substanţe amorfe, nemiscibile cu apa, solubile în benzen, cloroform şi eter şi insolubile în alcool etilic la rece. Nu sînt oxidabile şi sînt conservabile timp îndelungat. *Ceara de albine* conţine peste 33% palmitat de miricil, $C_{15}H_{31}COOC_{30}H_{31}$, un ester al acidului palmitic cu *alcoolul miricic*, 13,5% acizi superiori liberi şi peste 12% hidrocarburi.



Cetilpalmitat *Miricilpalmitat*



Alcool oleic

Din capul şi grăsimea de caşalot au fost izolate două ceruri : o ceară solidă *walratul* şi o ceară lichidă, *uleiul de spermaceti*. În compoziţia walratului predomină palmitatul de cetil, în uleiul de spermaceti se găsesc esteri ai unor acizi superiori nesaturaţi şi ai acizilor saturaţi cu C_{12}, C_{14} şi C_{16}.

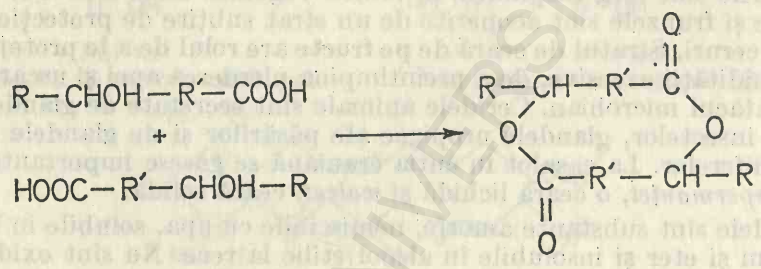
Ceara de Carnauba conţine cerotat de miricil, $C_{25}H_{51}COOC_{30}H_{61}$; este întîlnită la numeroase plante (bumbac, trestie de zahăr, cînepă). *Lanolina* este o ceară ce se obţine prin spălarea lînii oilor şi conţine, spre deosebire de alte ceruri, steroli (colesterol, 7-dehidrocolesterol etc.) fie în stare liberă, fie sub formă esterificată. Acizii graşi care se întîlnesc în compoziţia lanolinei (acizii *lanomiristic*, *lanopalmitic*) se caracterizează prin conţinutul lor în catene ramificate şi prin activitate optică. Lanolina are capacitatea de a lega o mare cantitate de apă (pînă la 300%).

Ceara de Montana a fost extrasă din cărbunii fosili și din torf.

Ceridele sînt utilizate în industrie pentru fabricare de hîrtie, de carton, materiale electroizolante, lacuri, vopsele și creioane, precum și pentru restaurarea tablourilor.

10.5 ETOLIDE

Etolidele sînt lipide speciale găsite în cerurile unor conifere. Ele sînt formate din moleculele acizilor hidroxilauric sau sabinic, și hidroxi 16-palmitic sau juniperic. În structura unei etolide intră două molecule de același acid ; una din molecule participă cu gruparea carboxil iar cealaltă prin gruparea hidroxil, la formarea celor două funcțiuni esterice care închid ciclul.



BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

11

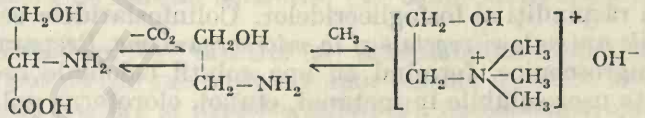
LIPIDE COMPLEXE. FOSFATIDE. GLICOLIPIDE

11.1 FOSFATIDE (FOSFOLIPIDE)

Fosfatidele sau *fosfolipidele* sînt substanţe complexe care conţin în molecula lor un alcool, o bază azotată, acizi graşi superiori şi acid fosforic.

La baza structurii fosfatidelor stă de regulă un alcool : *glicerol, inozitol, aminoalcoolul nesaturat sfingozina*, sau în alte cazuri *dihidrosfingozina*.

Unele fosfatide pot conţine în molecula lor resturile a două molecule de acizi graşi diferiţi. În calitate de baze azotate în structura fosfatidelor se întîlnesc *etanolamina* şi *colina*, substanţe apropiate ca structură chimică, iar în unele cazuri aminoacidul *serina*. Din serină prin decarboxilare se obţine etanolamina, iar din etanolamină prin metilare rezultă colină :



Serina *Etanolamina* *Colina*

Primele studii cu privire la structura chimică şi proprietăţile fizico-chimice ale fosfatidelor au fost făcute de T h u d i c h u m în 1884—1901, care le şi clasifică după raportul N/P în trei mari categorii *. În prezent,

* Clasificarea lui T h u d i c h u m prezintă astăzi numai interes istoric.

criteriul de bază al clasificării fosfatidelor este natura alcoolului din structura lor. După D e u e l, H u t t şi a l ţ i i fosfatidele se împart în :

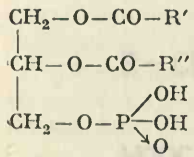
— *glicerofosfolipide* — (fosfogliceride, acizii *fosfatidici*), *etanolaminfosfolipide* (cefaline), *serinfosfolipide*, *acetalfosfolipide* şi *colinfosfolipide* (lecitine) * ;

— *sfingofosfolipide* (fosfosfolipide, fosfosfingozide) şi,

— *inozitolfosfolipide* (di- şi trifosfoinozitide).

11.1.1 Glicerofosfolipide

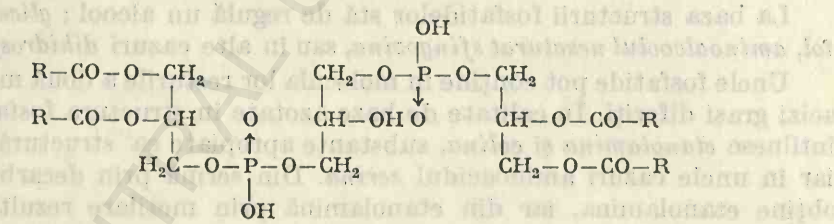
Sub termenul de *glicerofosfolipide* sînt reunite *fosfolipidele* care în urma *hidrolizei pun în libertate glicerol, două molecule de acizi graşi superiori, o bază azotată* (colina, etanolamina, serina) şi *o moleculă de acid fosforic.* Din această categorie fac parte *acizii fosfatidici, colinfosfolipidele, etanolaminofosfolipidele, serinfosfolipidele şi acetalfosfolipidele.*



Acid fosfatidic (Fosfatidilglicerol)

Acizi fosfatidici sînt glicerofosfolipide care conţin în molecula lor *glicerol, acizi graşi* şi un *rest al acidului fosforic.* Descoperiţi de C h i b n a l l şi C h a n n o n în 1927 în *frunzele de varză*, acizii fosfatidici au fost identificaţi mult mai tîrziu 1954—1959 de către D a w s o n şi H ü b s c h e r în *ţesutul nervos şi în ficat.* Ulterior, s-a demonstrat că acizii fosfatidici joacă un rol important în biosinteza fosfatidelor.

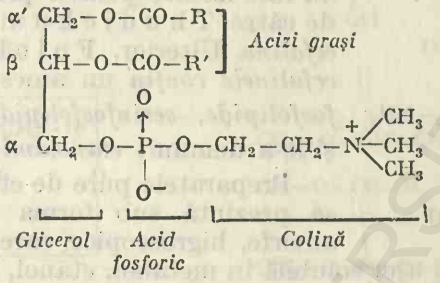
Cardiolipina este un fosfatid izolat din *muşchiul cardiac*, derivat al acizilor fosfatidici care conţine mai multe molecule de acizi fosfatidici, avînd următoarea formulă :



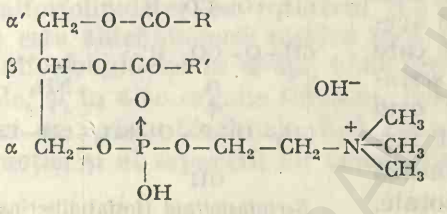
Colinfosfolipide (colinfosfatide). *Colinfosfolipidele* sînt reprezentanţii tipici cei mai răspîndiţi ai fosfogliceridelor. Colinfosfatidele se întîlnesc în toate *ţesuturile animale şi vegetale şi la microorganisme.* Preparatele lor sînt vîscoase şi higroscopice, formînd cu apa soluţii coloidale uşor colorate. Sînt substanţe uşor solubile în metanol, etanol, cloroform, sulfură de carbon, tetraclorură de carbon şi eter şi mai greu solubile în eter de petrol şi acetonă ; sînt însă solubile în soluţii de acetonă 90% (în apă). *Componentele lor structurale* sînt : *glicerolul, două molecule de acizi graşi superiori, colina şi o moleculă de acid fosforic.* Acizii graşi superiori şi acidul fosforic

* Terminologia utilizată este de dată recentă. În lucrări mai vechi se utilizează termenul de *lecitină* pentru *colinfosfolipide, cefalină* pentru *etanolaminfosfolipide* şi *plasmalogeni* pentru *acetalfosfolipide.*

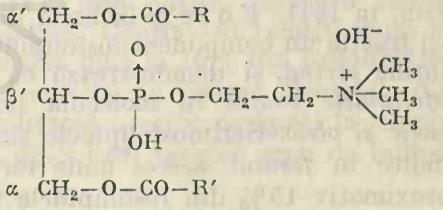
esterifică cele trei grupări hidroxil ale glicerinei; colina este esterificată de către acidul fosforic. *Acizii graşi* din colinfosfolipide sînt, de regulă, acidul *palmitic, stearic, oleic, linolic, linolenic şi uneori arahidonic.* K l e n k a izolat din ţesutul nervos colinfosfolipide care pe lîngă acizii graşi superiori saturaţi (palmitic, stearic) conţin şi acizi graşi superiori nesaturaţi, cu un număr par de atomi de carbon (C_{18}—C_{24}). În acelaşi timp, T h a n n h a u s e r izolează din ţesutul nervos colinfosfolipide care conţin numai acizi graşi superiori saturaţi. A b d e r h a l d e n, care a izolat o dipalmitinfosfolipidă din plămîni consideră totuşi că colinfosfolipidele de acest fel sînt rare. Structura unei colinfosfolipide (lecitine) se reprezintă astfel:



În funcţie de poziţia grupării hidroxil, care este esterificată cu acidul fosforic, colinfosfolipidele prezintă o izomerie de poziţie, α-colinfosfolipidele şi β-colinfosfolipidele (D e u e l, 1955). H a n a h a n consideră că



α-*Colinfosfolipid*



β-*Colinfosfolipid*

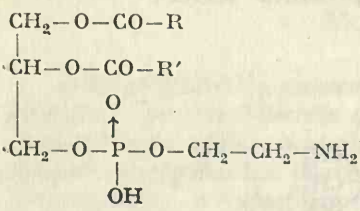
β-colinfosfolipidele nu sînt altceva decît artefacte care se formează în cursul izolării colinfosfolipidelor naturale. Datorită prezenţei în molecula lor a unui atom de carbon asimetric (β) colinfosfolipidele naturale sînt optic active.

Colinfosfolipidele, ca dealtfel şi etanolaminfosfolipidele şi acetalfosfolipidele pot pierde sub acţiunea unor enzime specifice unul din cei doi acizi graşi dînd naştere la *lizocolinfosfolipide, lizoetanolaminfosfolipide* etc. Lizoderivaţii glicerolfosfolipidelor au o acţiune hemolitică puternică însă rolul lor fiziologic rămîne necunoscut, cu atît mai mult cu cît în 1960 P o l o n o v s k i şi a l ţ i i au arătat că în sînge, în plasma sangvină şi în sistemul nervos sînt prezente în cantităţi mici diferite lizoglicerolfosfolipide.

Structura chimică şi proprietăţile fizico-chimice ale colinfosfolipidelor variază în funcţie de sursa din care au fost izolate. Astfel, de exemplu, colinfosfolipidul izolat de T h a n n h a u s e r şi c o l a b. din ţesutul ner-

vos și care conține doi acizi grași saturați, se prezintă sub forma unei substanțe albe, amorfe, ușor solubilă în majoritatea solvenților organici însă greu solubilă în acetonă și eter, în timp ce un preparat colinfosfolipidic obținut de H a n a h a n din drojdia de bere este solubil în eter, cloroform-alcool etilic, acetonă și greu solubil în eter de petrol. În soluții apoase colinfosfolipidele formează pelicule monomoleculare și se comportă ca amfiioni.

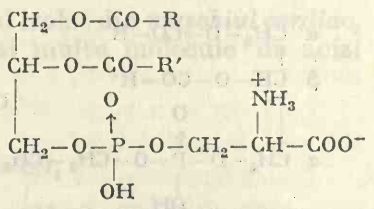
Etanolaminfosfolipide. Sînt asemănătoare ca structură chimică cu colinfosfolipidele. Spre deosebire de acestea ele conțin o altă bază azotată — *etanolamina*. Etanolamin-fosfolipidele au fost izolate pentru prima dată din creier de către T h u d i c h u m (1884) și denumite *cefaline*. Ulterior, F o l c h a demonstrat că *cefalinele conțin* un amestec de *etanolamin-fosfolipide*, *serinfosfolipide și difosfoinozitide* și le-a denumit *etanolaminfosfolipide*.



Etanolaminfosfolipid (fosfatidiletanolamina)

Preparatele pure de etanolaminfosfolipide se prezintă sub forma unei pulberi albe, amorfe, higroscopice, care în prezența aerului se închide la culoare, ușor solubilă în metanol, etanol, eter de petrol, acid acetic glacial și insolubilă în acetonă. Ca și colinfosfolipidele prin îndepărtarea unui acid gras din molecula lor dau naștere *lizofosfatidiletanolaminei*.

Serinfosfolipide (fosfatidilserine). M c. A r t h u r a observat că o parte din azotul fracției „cefalinice" izolate din creier nu poate fi identificat ca azot al colinei sau etanolaminei. Mult mai tîrziu, în 1941, F o l c h izolează din aceeași fracție un component fosfolipidic care conține *serină*, și demonstrează că *serinfosfolipidele conțin* în molecula lor *acid stearic și oleic*. Serinfosfolipidele sînt răspîndite în *țesutul nervos* unde formează aproximativ 15% din fosfolipidele totale. Ele au fost identificate și în alte organe animale (*ficat*, *mușchi* etc.) însă sînt absente în gălbenușul de ou.



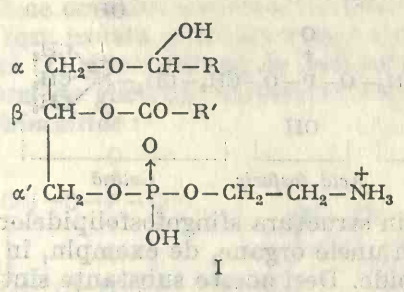
Serinfosfolipid (fosfatidilserina)

Acetalfosfolipide (plasmalogene). Au fost identificate la început prin metode chimice, cu ajutorul reactivului S c h i f f specific pentru aldehide. Izolate pentru prima dată de F e u l g e n și B e r s i n din *mușchiul de cal*, *acetalfosfolipidele* au fost obținute și din *țesutul nervos*.

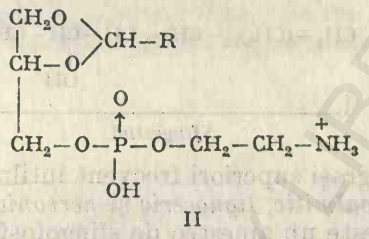
Preparatele de acetalfosfolipide se prezintă sub formă cristalizată și sînt solubile în benzen, alcool etilic, cloroform, acid acetic glacial și insolubile în acetonă și eter. Hidroliza acetalfosfolipidelor eliberează glicerilfosforiletanolamina și aldehide ale acizilor grași. Dintre ultimele au fost identificate *aldehidele acizilor palmitic și stearic* și nu s-a putut evidenția prezența unor aldehide ale acizilor grași superiori nesaturați. Dintre *bazele azotate* pe lîngă *etanolamină* au fost găsite și *serina și colina*.

În prezent în literatura de specialitate nu există o unitate de vedere cu privire la formula structurală a acestor compuși. Formulele de structură propuse de T h a n n h a u s e r și c o l a b. au fost supuse criticii de către

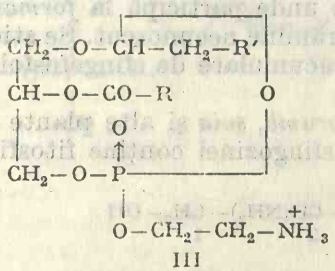
Klenk şi Debuch, iar Ansell şi Norman (1956) pe baza rezultatelor obţinute în urma hidrolizei acetalfosfolipidelor cerebrale au propus patru variante de formule structurale:



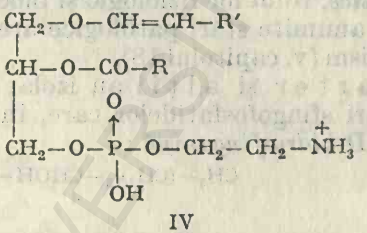
I



II



III



IV

Dintre toate formele structurale numai *I* şi *II* ar putea explica reacţia acetalfosfolipidelor cu reactivul Schiff, însă poziţia legăturii eterice care este aldehidogenă rămîne încă neclară. Conţinutul relativ mare al acetalfosfolipidelor în creier, unde formează pînă la 10% din fosfolipidele totale, şi în alte organe (muşchi, ficat) suscită un interes deosebit din punct de vedere biochimic, însă instabilitatea acestor compuşi în timpul extracţiei şi al separării lor constituie dificultăţi tehnice greu de învins.

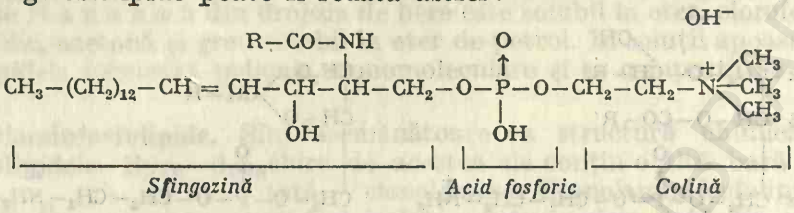
11.1.2 Sfingofosfolipide (fosfosfingozide)

Sfingofosfolipidele au fost studiate pentru prima dată de Thudichum în 1901 care printre produsele lor de *hidroliză* a identificat două *baze azotate colina* şi *sfingozina, un acid gras superior şi acid fosforic.* Sînt fosfolipide în molecula cărora nu intră glicerina; sînt insolubile în etanol la rece şi în eter, dar solubile în benzen, etanol fierbinte, acetat de etil. Sfingofosfolipidele sînt substanţe optic active.

În structura sfingofosfolipidelor cerebrale Karlson a identificat pe lîngă prezenţa *sfingozinei* şi prezenţa *dihidrosfingozinei* sau *sfinganinei.* Sfingozinele se prezintă sub formă amorfă, sînt incolore şi solubile în benzen, alcool etilic fierbinte, ester acetilacetic şi sînt substanţe optic active.

Sfingozina din structura sfingofosfolipidelor este un aminodialcool nesaturat sau 4-*sfingenina* şi ea introduce în molecula lipidului o a doua grupare amino, pe lîngă cea a bazei azotate. Prin intermediul acestei gru-

pări, sfingozina este legată amidic de molecula unui acid gras, iar prin funcţia alcool primară de acidul fosforic esterificat cu colina. Structura unei sfingofosfolipide poate fi redată astfel :



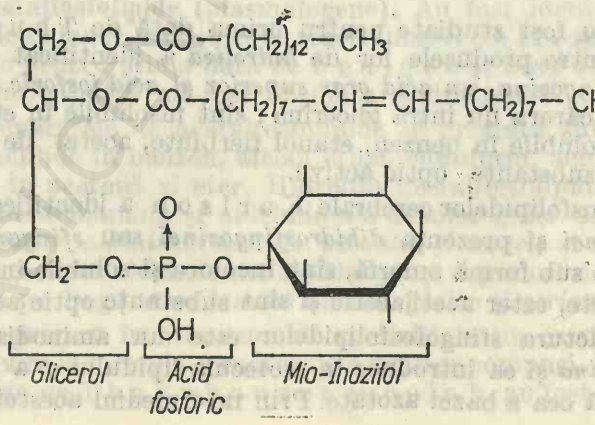
Acizii graşi superiori frecvent întîlniţi în structura sfingofosfolipidelor sînt acizii *palmitic, lignoceric* şi *nervonic*. În unele organe, de exemplu, în *ficat* se găseşte un amestec de sfingofosfolipide. Deşi aceste substanţe sînt larg răspîndite, îndeosebi în sistemul nervos, unde participă la *formarea tecii mielinice*, rolul lor fiziologic şi biochimic rămîne necunoscut. Se ştie numai că în anumite stări patologice are loc o acumulare de sfingofosfolipide în organism (v. capitolul 18).

Carter şi alţii au izolat din *porumb, soia* şi alte plante produşi similari sfingofosfatidelor care, în locul sfingozinei conţine fitosfingozină sau 4-*D-hidrosfinganină* :

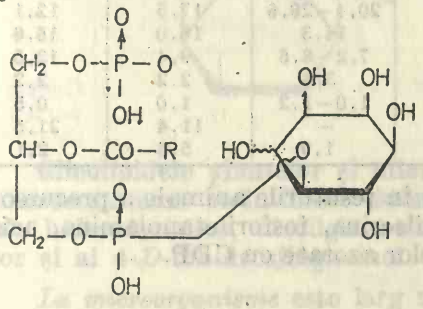
$$CH_3-(CH_2)_{13}-\underset{4}{CHOH}-\underset{3}{CHOH}-\underset{2}{CH(NH_2)}-\underset{1}{CH_2}-OH$$

11.1.3 Inozitolfosfolipide (fosfoinozitide)

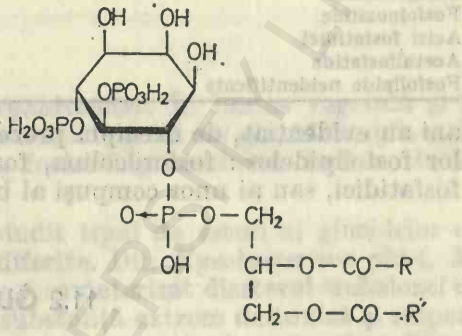
Prima dovadă evidentă a existenţei *fosfoinozitidelor* a fost adusă de Anderson în 1930 şi ulterior de Folch şi Woolley care studiază aprofundat această categorie de fosfolipide, răspîndită în lumea vegetală (de exemplu, în *soia* este cunoscută sub numele *de lipozitol*), la animale (*creier de bovine*) şi la *bacteriile acidorezistente*. În structura acestor compuşi au fost identificate următoarele substanţe : *glicerol, acizi graşi superiori, acid fosforic* (în cantităţi variabile după sursa din care au fost izolate fosfoinozitidele) şi un *alcool ciclic, inozitolul*, care ocupă locul componentelor azotate din molecula glicerofosfolipidelor. În fosfoinozitide, inozitolul se găseşte sub forma unui izomer optic inactiv, numit *mio*-inozitol (*mezo*-inozitol).



Fosfoinozitidele separate din creier și din alte țesuturi animale se prezintă sub forma unor preparate amorfe albe, solubile în cloroform și amestecuri de cloroform-metanol; sînt greu solubile în alți solvenți organici fapt ce constituie o caracteristică a acestor substanțe. Din țesutul nervos au fost izolate și caracterizate chimic inozitolfosfatide care conțin, unul, două (*I*) și trei resturi de acid fosforic (*II*) pentru o moleculă de inozitol și una de glicerol. Aceste substanțe au fost denumite *mono-*, *di-*, și *trifosfoinozitide*:

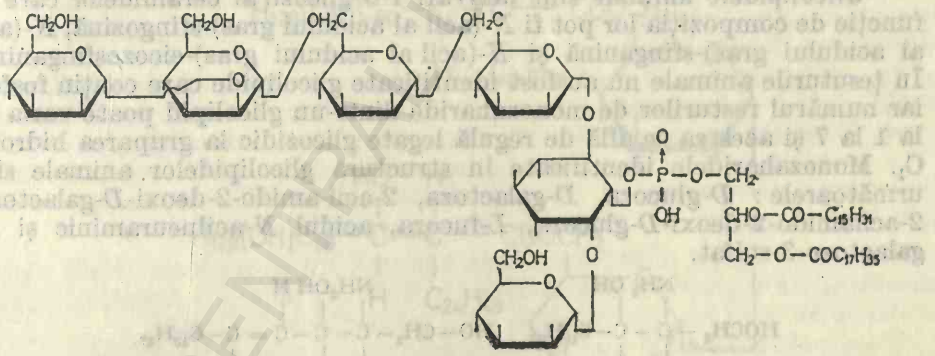


I



II

De la micobacterii a fost izolat un glicozid care conține cinci resturi de manoză și un rest de 1-fosfatidil-*L-mio*-inozitol, iar din *Mycobacterium tuberculosis* și *M. phlei* au fost izolate numeroase di- și penta-*D*-manozide. Structura glicolipidului izolat este următoarea:



Bacillus megaterium cultivat la $pH = 5.0$ sintetizează un glicozid al fosfatidil-*D*-glicerolului cu structura *1,2-di-0-acilglicerol-3-fosforil-1'—[2'-0-(2-amino-2-deoxi-β-D-glucopiranozil)]-glicerol*, care este de fapt unul din puținele lipide naturale în care gruparea amino a ozei componente este liberă. Acest glicozid se găsește în cantități apreciabile în lipidele celulare.

Pe lîngă fosfolipidele descrise mai sus și care se găsesc în cantități relativ mari în sistemul nervos central al mamiferelor (tabelul 11.1) în țesuturi se găsesc, probabil și alte lipide care conțin fosfor. Cercetările din ultimii

TABELUL 11.1

Diferite fosfatide izolate din creierul diverselor animale
(*După* Dawson *și alții 1960, 1961,* Smirnov *și colab. 1961,* Dumitru *1962*)

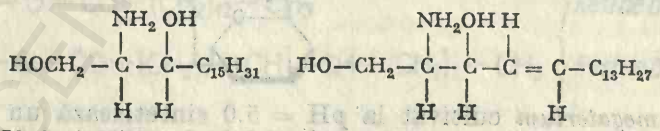
Fosfatidul, în %	*Șobolan*	*Oaie*	*Bou*
Colinfosfatide	40—50	38,6	29,2
Etanolaminfosfatide	20,4—29,6	17,5	12,1
Serinfosfatide	14,3	16,0	16,6
Sfingomieline	7,2—8,6	9,4	12,5
Fosfoinozitide	3,6	2,2	2,2
Acizi fosfatidici	1,0—1,2	1,0	0,5
Acetalfosfatide	—	11,4	21,5
Fosfolipide neidentificate	1,9	5,6	2,1

ani au evidențiat, de exemplu prezența în țesuturile animale a precursorilor fosfolipidelor : fosforilcolina, fosforilserina, fosforiletanolamina, acizii fosfatidici, sau ai unor compuși ai bazelor azotate cu CDP.

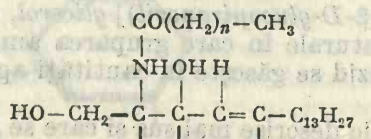
11.2 GLICOLIPIDE

Lipidele care conțin baze azotate și glucide, dar în molecula cărora nu este prezent fosforul sînt cunoscute sub denumirea de *glicolipide*. Din această categorie fac parte *glicolipidele vegetale și microbiene*, *cerebrozidele*, *gangliozidele* și *sulfocerebrozidele* sau *sulfatidele*.

Glicolipidele animale sînt derivați 1-*O*-glicozil ai ceramidelor care în funcție de compoziția lor pot fi *N*-(acil al acidului gras)-sfingozină, *N*-(acil al acidului gras)-sfinganină și *N*-(acil al acidului gras)-eicozosfinganină. În țesuturile animale nu au fost identificate glicolipide care conțin fosfor, iar numărul resturilor de monozaharide dintr-un glicolipid poate varia de la 1 la 7 și acestea se află de regulă legate glicozidic la gruparea hidroxil C_1. Monozaharidele identificate în structura glicolipidelor animale sînt următoarele : *D*-glucoza, *D*-galactoza, 2-acil-amido-2-deoxi-*D*-galactoza, 2-acilamido-2-deoxi-*D*-glucoza, *L*-fucoza, acidul *N*-acilneuraminic și *D*-galactozo-3-sulfat.

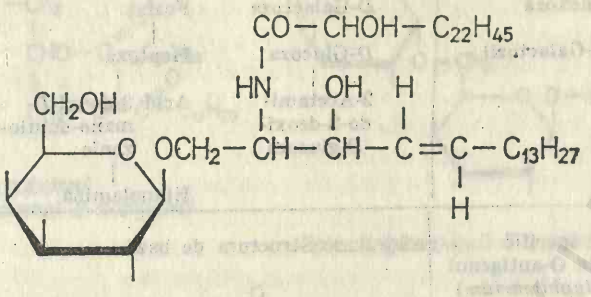


D-Sfinganina (Dihidro-sfingenina) Sfingozina (*Sfingenina*)



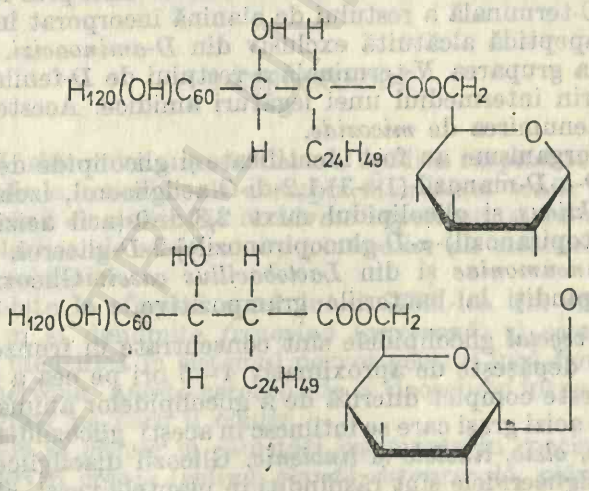
Ceramid

Structura chimică a unui 1-*O*-glicozilceramid poate fi ilustrată prin *N*-cerebronil-(1-*O*-β-*D*-galactopiranozil)-sfingozină denumită și *frenazină*:



Glicolipidele plantelor și microorganismelor. În lumea vegetală și la microorganisme se întîlnesc esteri ai acizilor grași cu glucidele, glicozide ale hidroxiacizilor, diacilglicerolului, fosfatidilglicerolului, fosfoinozitidelor și ai 4-*D*-dihidrosfinganinei.

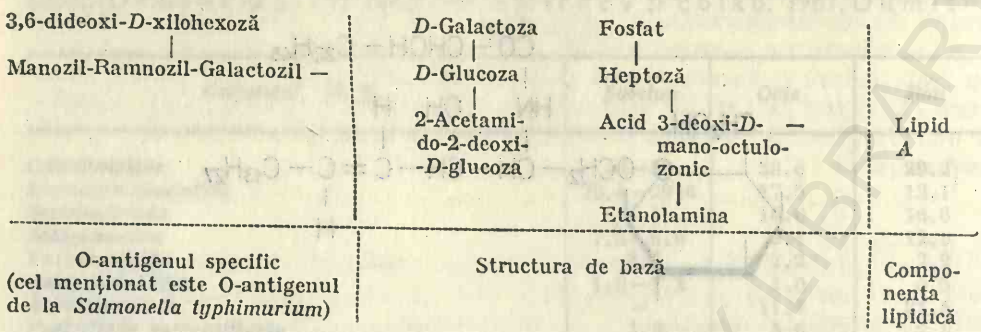
La microorganisme este larg răspîndit tipul de esteri ai glucidelor cu acizii grași unde îndeplinesc funcții diferite. Din *Mycobacterium phlei*, *M. smegmatis*, *M. avium* ș.a., a fost extras și caracterizat diesterul trehalozei cu *acidul micolic*, denumit și *cord factor* substanță extrem de toxică și responsabilă pentru virulența diferitelor tulpini ale acestui microorganism. Structura acestui diester este următoarea:



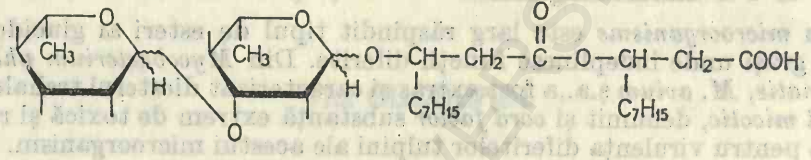
α,α-Trehaloză-6,6'-dimicolat

La *Enterobacteriaceae* a fost evidențiată prezența unor *lipopolizaharide* care acționează ca antigeni specifici de suprafață și sînt răspunzătoare pentru activitatea endotoxinelor. Aceste lipopolizaharide sînt utilizate drept criteriu imunologic în clasificarea acestor microorganisme; struc-

tura lor este complexă și incomplet elucidată. În principiu această structură poate fi reprezentată schematic astfel (M c K i b b i n, 1970):



Din mediul de cultură al *Pseudomonas aeruginose* a fost izolat un glicolipid care conține ramnoză:



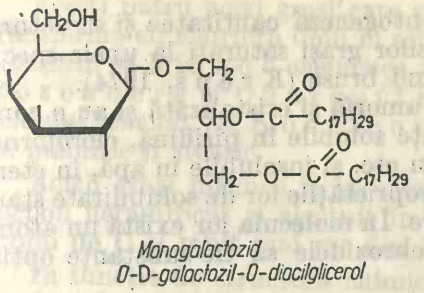
iar din cerurile de *Mycobacteria* au fost izolate peptidoglicolipide care conțin *6-deoxi-L-taloză* și *3-O-metil-6-deoxi-L-taloză* unite prin legături esterice cu gruparea *C*-terminală a restului de alanină încorporat într-o pentapeptidă sau hexapeptidă alcătuită exclusiv din *D-aminoacizi*. Acidul *micolic* este prezent la gruparea *N*-terminală a restului de *D*-fenilalanină de care este atașat prin intermediul unei legături amidice. Aceste *peptidoglicolipide* poartă denumirea de *micozide*.

La microorganisme au fost identificate și glicolipide de tipul *O*-α-manozil-(1→3) *O*-α-*D*-manozil-(1→3)-1,2-di-*O*-acilglicerol, izolat de la *Micrococcus lysodeikticus* și glicolipidul mixt 2,3-di-0-(acil acizi grași)-1-*O*-[2′-*O*-(α-*D*-galactopiranozil)-α-*D*-glucopiranozil)]-2-*D*-glicerol, separat din *Diplococcus pneumoniae* și din *Lactobacillus casei*. Glicozildiacilglicerolii sînt larg răspîndiți la bacteriile grampozitive.

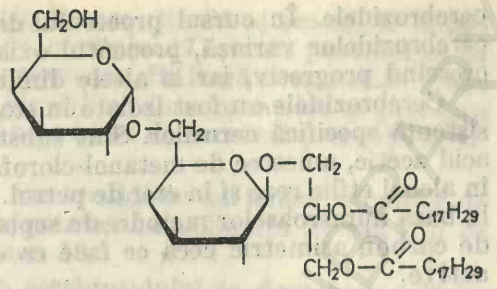
În regnul vegetal glicolipidele sînt concentrate în frunzele verzi unde cantitatea lor depășește de aproximativ 4—5 ori pe cea a fosfatidelor, iar structura lor este complet diferită de a glicolipidelor animale.

Principalii acizi grași care se întîlnesc în acești glicozildiacilgliceroli sînt acizii *palmitic*, *oleic*, *linoleic* și *linolenic*. Glicozil diacilglicerolii împreună cu sulfoglicozilgliceridele sînt răspîndiți în plantele verzi, alge și bacteriile fotosintetizante, unde se găsesc în membranele lamelare ale cloroplastelor.

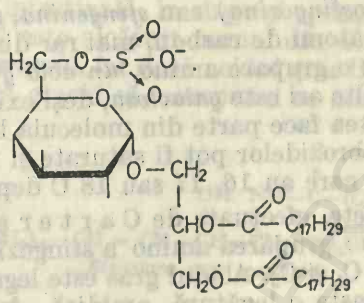
Dacă plantele verzi fotosintetizante sînt expuse într-o atmosferă de $^{14}CO_2$ partea glucidică a glicolipidelor vegetale, respectiv galactoza, încorporează trasorul radioactiv ^{14}C, ceea ce a condiționat formularea ipotezei că aceste substanțe îndeplinesc rolul de substanțe de rezervă pentru glucide. Glicolipidele vegetale care nu conțin în structura lor sulf sînt probabil legate specific de cloroplastele celulare.



Monogalactozid
O-D-galactozil-O-diacilglicerol



Digalactozilglicerid sau Di-O-D-galactozil-di-O-acilglicerol



Sulfoglucozilglicerid sau 2,3-di-O-acil-
-1-O-(6-deoxi-α-D-glucopiranozil)-gliceroisulfat

11.3 CEREBROZIDE

Cerebrozidele sînt substanţe de natură lipidică răspîndite în lumea animală *începînd de la actinii* — de exemplu, *Metridium senile* şi *Asterias rubens* — şi *încheind cu animalele vertebrate superioare şi cu omul.* Ele sînt componente *plastice ale membranelor plasmatice ale celulelor renale, hepatice, nervoase* şi *mielinice.*

Au fost izolate la sfîrşitul secolului al XIX-lea din creier de către T h u d i c h u m şi denumite *frenozină* (*cerebronă*) şi *cerazină.* În anul 1925 K l e n k identifică în sistemul nervos central încă două cerebrozide *nervona* şi *oxinervona.* Aceste cerebrozide se deosebesc între ele prin structura acizilor graşi pe care îi conţin.

Cerebrozidele se găsesc în cantităţi însemnate în special în *creier* dar şi în alte *ţesuturi şi organe* (*splină, glandă suprarenală, plămîni, eritrocite,* leucocite etc.).

Componente principale ale tecilor mielinice, cerebrozidele se găsesc în cantităţi mai mari în substanţa albă, în fracţiile grea şi uşoară a microsomilor, ajungînd la mamiferele superioare, la aproximativ 20—25 mg/1 gram greutate umedă în cazul creierului şi la aproximativ 50 mg/1 gr greutate umedă în cazul măduvei coloanei vertebrale. Procentul cerebrozidelor care conţin hidroxiacizi graşi ca şi numărul atomilor de C ai acestora sînt funcţie de organul sau de fracţia subcelulară din care au fost extrase

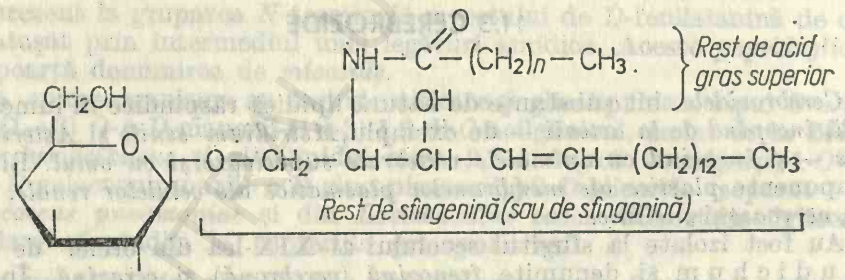
cerebrozidele. În cursul procesului de ontogeneză cantitatea și structura cerebrozidelor variază, procentul oxiacizilor grași saturați la unele specii crescînd progresiv, iar la altele diminuînd brusc (K r e p s, 1974).

Cerebrozidele au fost izolate în stare amorfă și cristalizată și au o consistență specifică cerurilor. Sînt substanțe solubile în piridină, cloroform, acid acetic, amestec de metanol-cloroform etc. și insolubile în apă, în eter, în alcool etilic rece și în eter de petrol. Proprietățile lor de solubilitate stau la baza numeroaselor metode de separare. În molecula lor există un atom de carbon asimetric ceea ce face ca cerebrozidele să fie substanțe optic active.

În molecula cerebrozidelor intră un *aminoalcool primar superior* nesaturat *sfinganina (dehidrosfingozina)* sau *sfingenina*, care de cele mai multe ori este alcătuit din 16 atomi de carbon, mai rar din 20 atomi de C și are două grupări hidroxil și o grupare amino, *un acid gras superior* și *un glucid*, care de cele mai multe ori este *galactoza*, deși există dovezi experimentale că și glucoza ar putea face parte din molecula lor. În general, sfingozinele din molecula cerebrozidelor pot fi saturate și nesaturate și numărul derivaților lor naturali care au 16, 17 sau 18 C depășește cifra de 60.

După studiile complete, efectuate de C a r t e r și c o l a b. s-a stabilit structura cerebrozidelor : gruparea amino a sfingozinei este situată la C_2 iar grupările hidroxil la C_1 și C_3. Acidul gras este legat la gruparea $-NH_2$ de la C_2 formînd cu aceasta o legătură amidică, în timp ce galactoza se leagă la nivelul hidroxilului C_1 al sfingozinei.

Formula structurală de principiu a unei cerebrozide, care este *1-O-β-D-galactopiranozilceramid*, poate fi redată astfel :



Cerebrozidele se deosebesc între ele prin natura acidului gras pe care-l conțin : *cerazina* conține acid lignoceric, *cerebrona* — acid cerebronic, *nervona* conține acid nervonic, iar *oxinervona* — acid oxinervonic :

$CH_3-(CH_2)_{22}-COOH$ (24)
Acid lignoceric

$CH_3-(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_{13}-COOH$ (24, 15)
Acid nervonic (Acid Δ15-lignoceric)

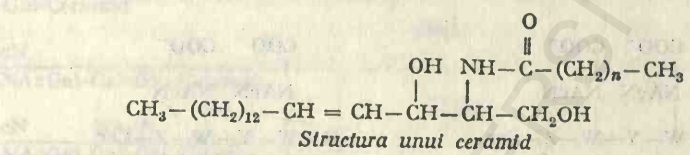
$CH_3-(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_{12}-CHOH-COOH$ (24, 15, 2)
Acid oxinervonic
(Acid 2-hidroxinervonic)

$CH_3-(CH_2)_{21}-CHOH-COOH$ (24, 2)
Acid cerebronic
(Acid 2-hidroxilignoceric)

Aceşti patru acizi graşi care conţin fiecare cîte 24 atomi de C se pot transforma cu uşurinţă unul în altul (v. capitolul 17) şi este probabil că în organism să aibă loc o asemenea transformare. Pe lîngă aceşti acizi graşi, Rosenberg şi Chargaff au identificat în cerebrozide şi prezenţa *acidului behenic*, iar Kocetcov şi alţii au demonstrat prezenţa acizilor palmitic şi stearic.

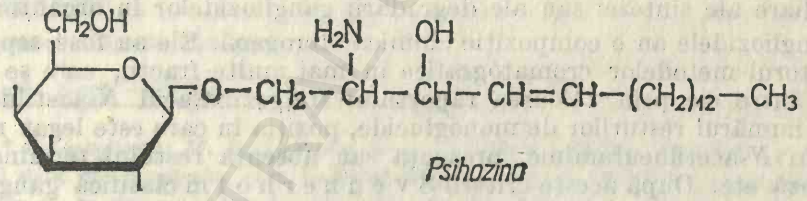
Acizii graşi întîlniţi în structura cerebrozidelor au lanţul atomilor de carbon neramificat şi alcătuit în majoritatea cazurilor din 22 sau din 24 atomi de C şi mult mai rar din 16 sau 18.

În funcţie de structura chimică a cerebrozidului se deosebesc *galactocerebrozide* prezente aproape exclusiv în creierul uman şi *glucocerebrozide*, răspîndite în mucoasa intestinală, în sînge şi splină; cînd glucidul nu este prezent şi cerebrozidul este alcătuit numai din acid gras şi sfingozină el poartă denumirea de *ceramid*, iar dacă acidul gras lipseşte, dar este prezent componentul de natură glucidică, compusul se numeşte *psihozina*.



Structura unui ceramid

Ceramidele sînt compuşi răspîndiţi în regnurile vegetal şi animal, fiind componente minore ale constituenţilor celulari de natură lipidică. Ele conţin acizi graşi superiori cu număr par de atomi de carbon 16, 18, 22 şi 24. Din punct de vedere chimic ceramidele pot fi considerate derivaţi *N*-acilaţi ai sfingeninei (sfingozinei).



Psihozina

Psihozina este un compus intermediar important în biosinteza galactocerebrozidelor.

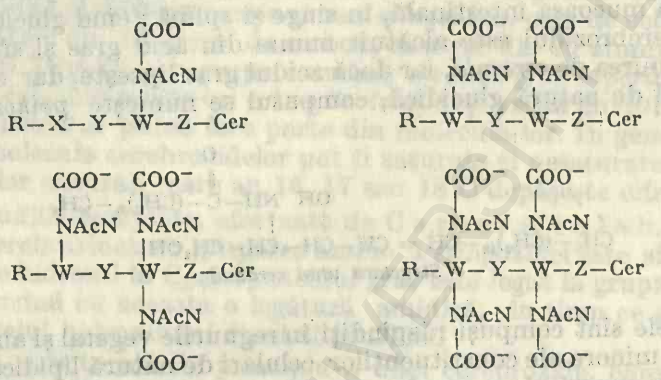
În boala lui Gaucher (v. cap. 18) 1-*O*-*D*-glicozilceramidele se acumulează în ficat şi în splină în cantităţi care depăşesc de 10—20 ori cantitatea normală.

Gangliozidele. Au fost izolate pentru prima dată de Klenk în 1941 din creierul unor pacienţi suferinzi de boala Niemann-Pick. Spre deosebire de restul lipidelor, gangliozidele sînt substanţe solubile în amestecuri de benzen-etanol, în piridină şi acid acetic glacial; sînt insolubile în acetonă şi eter.

Molecula gangliozidelor cerebrale este alcătuită din aproximativ 100 de monomeri (uneori chiar mai mulţi) în structura cărora se întîlneşte o

parte hidrofilă oligoglucidică și o *parte hidrofobă de natură ceramidică* (sfingozina și restul unui acid gras, cuplate prin intermediul unei legături -CO-NH-). *N*-Acetil-galactozamina este o componentă specifică a moleculelor de gangliozide cerebrale.

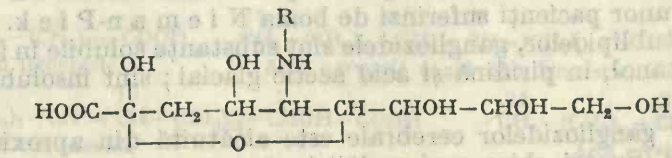
Dacă se notează cu *X*—galactoza, cu *Y*—N-*O*-acetilgalactoza, cu *W*—COO^-—galactoza legată cu restul (resturile) de acid *N*-acetilneuraminic, cu *Z*—restul de glucoză, cu *Cer*—restul de ceramidă iar cu *R*—radicalul monomerului gangliozidelor se observă că resturile de acid *N*-acetil neuraminic (*NAcN*) sînt orientate către suprafața moleculelor de gangliozide și conferă acestora proprietăți polianionice hidrofile.



După cum se vede din tabelul 11.2 unele fracții gangliozidice sînt prezente în creier în cantități mici (GM2, GM3 și GD2) din care cauză ele au fost denumite *fracții minore*, care după părerea unor autori ar fi forme intermediare ale sintezei sau ale degradării gangliozidelor în organism.

Gangliozidele au o compoziție chimică eterogenă. Ele au fost separate cu ajutorul metodelor cromatografice în mai multe fracții, care se deosebesc între ele prin valoarea raportului sfingozină/acid *N*-acetilneuraminic, numărul resturilor de monoglucide, poziția în care este legat restul acidului *N*-acetilneuraminic, prezența sau absența restului terminal de galactoză etc. După aceste criterii S v e n n e r h o l m clasifică gangliozidele în opt categorii (fracții diferite ca structură și compoziție chimică (tabelul 11.2).

Molecula gangliozidelor monomer conține C^{18} sau C^{20}-*sfingozină*, *un un acid gras*, 1—3 resturi de *glucide* (de cele mai multe ori *galactoza*, dar și *glucoza*) și *acid neuraminic*. B r a n t e și S v e n n e r h o l m au arătat că resturile de galactoză se găsesc sub formă de *galactozamină* și numărul lor în structura gangliozidelor variază cu vîrsta.



Acid neuraminic

Structura, clasificarea și conținutul procentual relativ al glicozidelor în creierul de om (după Svennerholm, 1970 și Krebs, 1974)

Structura gangliozidului	*Denumirea codificată a gangliozidului**	*Conținut procentual în creierul de om*	
		Substanța albă	*Substanța cenușie*
1) Gal-NAcGal-Gal-Glu-Ceramid | NAcN	GM1	13	33
2) NAcGal-Gal-Glu-Ceramid | NAcN	GM2	2	3
3) Gal-Glu-Ceramid | NAcN	GM3	2	4
4) Gal-NAcGal-Gal-Glu-Ceramid | | NAcN NAcN	GD1*a*	22	21
5) Gal-NAcGal-Gal-Glu-Ceramid | NAcN-NAcN	GD1*b*	24	15
6) NAcGal-Gal-Glu-Ceramid | NAcN-NAcN	GD_2	3	3
7) Gal-Glu-Ceramid | NAcN—NAcN	GD_3	—	—
8) Gal-NAcGal-Gal-Glu-Ceramid | | NAcN NAcN—NAcN	GT_1	31	19

* *G*—gangliozid; *M*, *D*, *T*—mono, di—, tri—indică numărul resturilor de molecule de acid sialic din gangliozid; cifra 1—indică prezența a patru resturi de monoglucide (gal-galactoza și glu-glucoza); cifra 2—lipsa unui rest de galactoză din cele 4 resturi de monoglucide; cifra 3—lipsa restului de galactoză și a *N*-acetil galactozaminei (NAcGal); *a* și *b* —modul de legare a celui de al doilea rest al acidului neuraminic.

Acidul neuraminic este un constituent specific al gangliozidelor în structura cărora intră sub formă de acid *N*-acetilneuraminic denumit și *acid sialic*. El a fost identificat și în compoziția *mucoproteidelor și mucopoliglucidelor* din diferite organe și țesuturi.

Natura acizilor grași întîlniți în structura gangliozidelor cerebrale izolate de la om și mamiferele superioare este mai puțin variată decît a acizilor grași întîlniți în alte componente lipidice ale creierului. În gangliozide predomină acizii stearic (80—90% din totalul acizilor grași) palmitic (10%) și lipsesc sau se găsesc în cantități foarte mici *acizii grași ramificați* și *acizii grași nesaturați*.

11.4 SULFOLIPIDELE

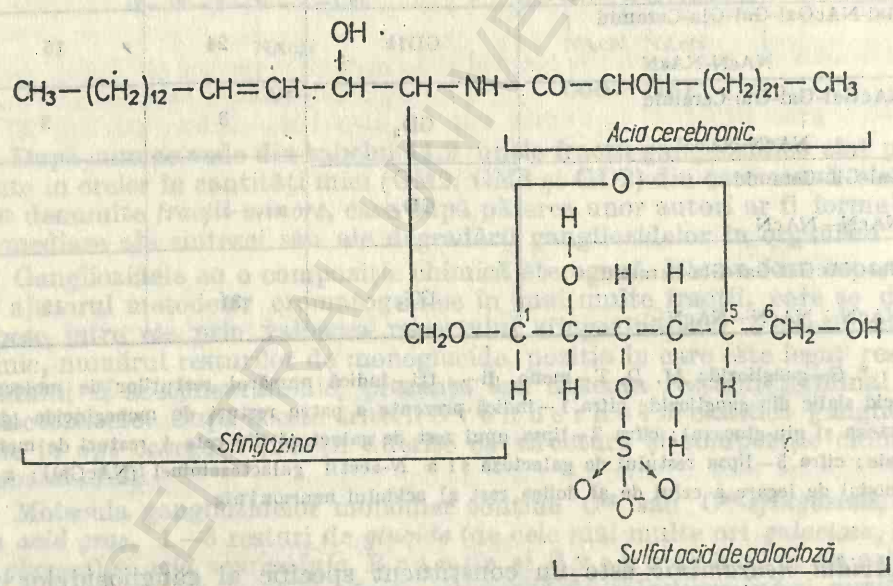
Lipidele care conţin sulf sau *sulfolipidele* sînt clasificate după forma în care se găseşte atomul de sulf în structura lor, în:

— *sulfatide* — sînt sulfolipidele în care sulful se întîlneşte sub forma unui ester al acidului sulfuric;

— *sulfonolipide* — sînt sulfolipidele în care sulful se află sub formă de acid sulfonic;

— *halosulfatide* sau *halogenosulfatide* — sînt sulfatidele care conţin în molecula lor atomi de halogeni, cel mai frecvent atomi de clor şi mai rar, atomi de brom.

Sulfatide (sulfocerebrozide). *Sulfatidele sînt lipide care conţin sulf şi uneori şi fosfor*, sînt asemănătoare ca structură cu cerebrozidele şi gangliozidele şi în molecula lor adesea se găseşte galactoză. Structura chimică a unui sulfatid este:



Sulfatidele au fost *identificate şi izolate din creier*, din *partea medulară a suprarenalelor*, *glanda salică a păsărilor marine*, din *glanda rectală a rechinului* etc. În creier sulfatidele sînt localizate, îndeosebi, în substanţa albă şi în cantităţi mult mai mici în substanţa cenuşie.

În sulfatidele izolate din creierul mamiferelor predomină acizii nervonic şi lignoceric; în cantităţi mai mici se găsesc şi acizii oleic, stearic şi palmitic, iar acizii graşi cu mai multe duble legături lipsesc.

Concentraţia sulfatidelor în creierul animalelor cu sînge cald este mult mai mică decît a cerebrozidelor ele constituind aproximativ 2—4 mg/g substanţă umedă şi au fost identificate în nucleu, sinapse, microsomi, mitocondrii şi în structura lipidelor din membranele specializate. În cursul ontogenezei cantitatea de sulfatide din creier este mai mare decît cea a cerebrozidelor, în primele faze de dezvoltare, dar diminuează treptat pe măsura dezvoltării complete a sistemului nervos central. Numai la unele organisme animale — *Torpedo marmorata*, *Lepidosteus osseus* — sulfatidele se găsesc în concentraţii mai mari decît cerebrozidele (K r e b s, 1973).

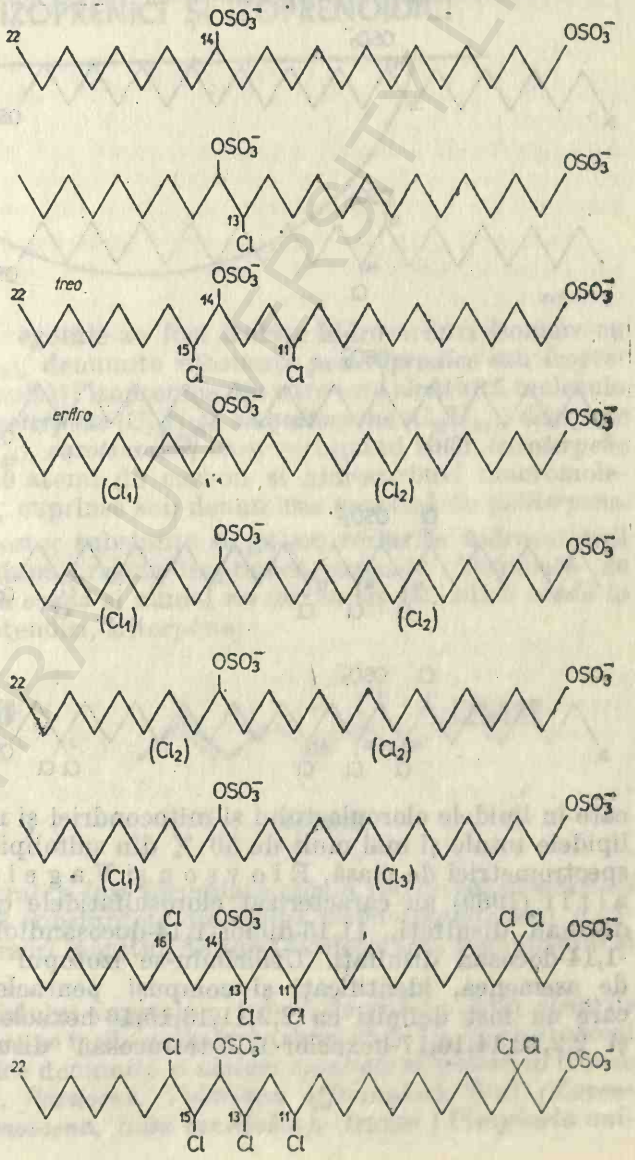


Fig. 11.1. — Structura alchildiol disulfaţilor cloruraţi cu 22 atomi de carbon. Atomii de clor cu indici scrişi în paranteze indică numărul lor în moleculă şi poziţia incertă în catena hidrocarburii (după Haines, 1975).

Halosulfatidele sau *halogenosulfatidele* au fost descrise pentru prima dată în 1969 de Mayers și Haines și alcătuiesc o grupă mică de lipide cu proprietăți distincte. Mayers și Haines (1969), Mayers, Pousada și Haines (1969) le-au izolat din fitoflagelatul *Ochromonas danica* și au semnalat prezența lor și în *Ochromonas malhamensis*. Clorosulfatidele sînt lipide neobișnuite, care prezintă o catenă alifatică neramificată constituită din 22 sau din 24 atomi de carbon, două grupări sulfurice esterificate și doi pînă la șase atomi de halogen (fig. 11.1). Molecula clorosulfatidelor prezintă astfel două grupări polare, iar raportul S/C este de 1 :11. La fitoflagelatul *Ochromonas danica*, clorosulfatidele au fost identifi-

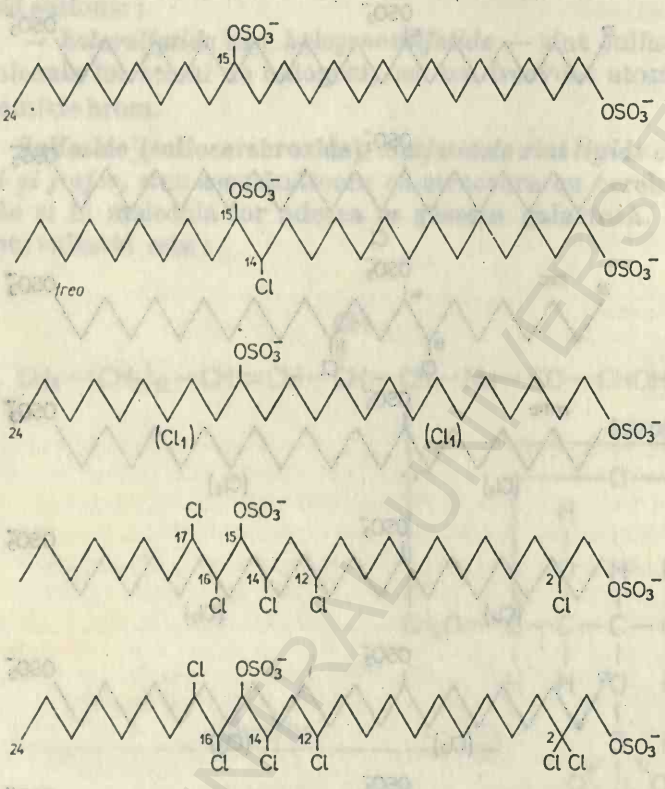


Fig. 11.2. — Structura chimică a alchildiol disulfaților cloruranți (clorosulfolipide) izolați din fitoflagelatul *Ochromonas danica*. Atomii de clor scriși în paranteze indică numărul lor în moleculă și poziția incertă în catena hidrocarburii (după Haines, 1974).

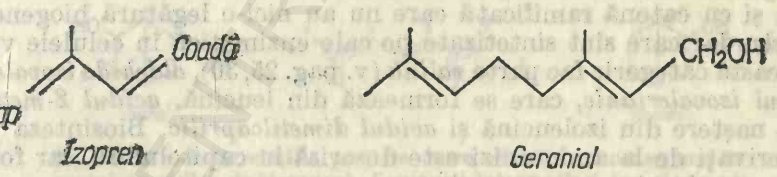
cate în lipidele cloroplastului și mitocondriei și reprezintă peste 10 % din lipidele totale și mai mult de 50 % din sulfolipidele celulare. Cu ajutorul spectrometriei de masă, Elovson și Vagelos (1969) și Haines și alții (1969) au caracterizat clorosulfatidele ca *treo*-(R)-13-cloro-1-(R)-docosan disulfați, 11,15-diclor-1,14-docosandiol disulfați și 2,2-diclor--1,14-docosan disulfați. Utilizîndu-se izotopul radioactiv ^{36}Cl au fost, de asemenea, identificați și compuși pentacloruranți și hexacloruranți, care au fost definiți ca 2,2,11,13,15,16-hexaclor-1, 14-docosan disulfați și 2,2,12,14,16,17-hexaclor-1,15-tetracosan disulfați (fig. 11.2).

12

STEROIZI. COMPUȘI IZOPRENICI ȘI IZOPRENOIDICI

Din numeroase surse vegetale au fost izolate hidrocarburi izomere cu formula moleculară $(C_5H_8)_n$ denumite substanțe *poliizoprenice* sau *izoprenoide*. După numărul de unități izoprenice din care este alcătuită molecula acestora se deosebesc *monoterpene* ($C_{10}H_{16}$), *sesquiterpene* ($C_{15}H_{24}$), *diterpene* ($C_{20}H_{32}$), *triterpene* ($C_{30}H_{48}$), *carotenoizii*, care corespund unor *tetraterpene* și conțin în moleculă 40 atomi de carbon și hidrocarburi macromoleculare cu formula $(C_5H_8)_n$ cuprinse sub denumirea generică de *politerpene*.

La baza structurii acestor substanțe se găsesc resturile hidrocarburii *izopren* legate între ele după „regula izoprenică parțială" formulată de Ruzicka (1921) *cap la coadă* și numai *rareori* în alt fel, adică *coadă la coadă* (ca în steroizi, carotenoizi, triterpene):



Izopren *Geraniol*

Pentru compușii naturali a fost formulată *regula izoprenică biogenetică* care postulează faptul că substanțele din grupa izopentenului sînt derivați simpli ai unor precursori ipotetici de tipul farnezolului, geraniolului și squalenului.

Prin distilarea materialului vegetal cu vapori de apă se obțin *uleiurile eterice* în compoziția cărora se întîlnesc hidrocarburi cu 5, 10, 15 și 20 atomi de carbon. Uleiurile eterice denumite și *uleiuri esențiale* se găsesc în frunze *(Cymbopogon nardus, C. flexuosus, Valeriana officinalis)*, flori *(Lavendula officinalis, Rosa demoscena, Rosa centifolia)*, fructe *(Pimpinela ani-*

sum, Carum carvi, Cananga odorata), semințe· *(Foeniculum vulgare)*, în cojile de citrice, în mere, piersici etc. Compoziția uleiurilor eterice variază cu specia botanică, cu clima și regiunea în care crește planta și în general constă din hidrocarburi aromatice sau/și ciclice, precum și derivații oxigenați ai acestora. Cantitatea de uleiuri eterice în cojile de portocale formează 1,2—2%, în lămîi — 1,5—2%, în mandarine 1,9—2,5%; în compoziția uleiurilor extrase din cojile de portocale se întîlnesc limonenul, citralul, linoloolul, esterii acizilor butiric și caprilic, iar cele obținute din lămîi constau din limonen (90%) și din citral (3—5%), precum și din alte terpene și esteri ai acizilor. Uleiul de mandarin constă în principal din limonen, iar mirosul lui plăcut se datorește esterului metilic al acidului antranilic.

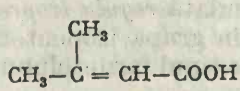
Uleiurile eterice extrase din frunze, flori, fructe, semințe, coji de citrice ș.a. sînt utilizate pe scară largă în industria parfumurilor, pentru aromarea sucurilor de fructe, în procesele de fabricare a lichiorurilor și în cofetărie. Alte plante, de exemplu *Dictamnus albus*, sînt capabile să producă uleiuri volatile care conțin diferite substanțe aromatice cu un miros pătrunzător care sînt de fapt hidrocarburi cu catenă liniară sau derivați ai acestora.

Numeroși arbuști și unele plante superioare tropicale secretă *latexuri* sau *gume vegetale* care conțin *cauciuc*, rășini, ceruri, proteine, apă și substanțe minerale. Din categoria acestor plante fac parte peste 500 de specii vegetale din familiile *Maraceae*, *Euphorbiaceae*, *Sapotaceae*, *Dipterocarpaceae*, *Leguminosae* etc.

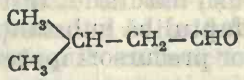
În cele ce urmează vor fi expuse succint structura și proprietățile principalelor terpenoide importante pentru biochimia substanțelor izoprenice și izoprenoidice.

12.1 SEMITERPENE

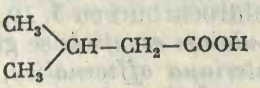
În plante au fost descoperite numeroase substanțe cu cinci atomi de carbon și cu catenă ramificată care nu au nici-o legătură biogenetică cu *terpenele*, dar care sînt sintetizate pe cale enzimatică în celulele vegetale. Din această categorie fac parte *valina* (v. pag. 25, 30), *aldehida izovalerianică* și *acidul izovalerianic*, care se formează din leucină, *acidul 2-metilbutiric* care ia naștere din izoleucină și *acidul dimetilcaprilic*. Biosinteza compușilor derivați de la aminoacizi este descrisă în capitolul 19, iar formulele lor structurale sînt următoarele:



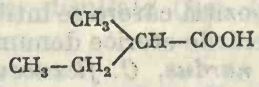
Acid dimetilcaprilic



Aldehida izovalerianică



Acid izovalerianic



Acid 2-metilbutiric

Monoterpenele sînt *substanţe alcătuite din cîte două unităţi izoprenice după regula geraniolului* a lui R u z i c k a. Ele sînt substanţe larg răspîndite în natură formînd peste 100 de combinaţii şi întîlnindu-se în procente ce variază de la 2% la 98% în diferite specii de pin *(Pinus pinea, Pinus monticola, Pinus contorta, Pinus ponderosa, Pinus attenuata* ş.a.). Din

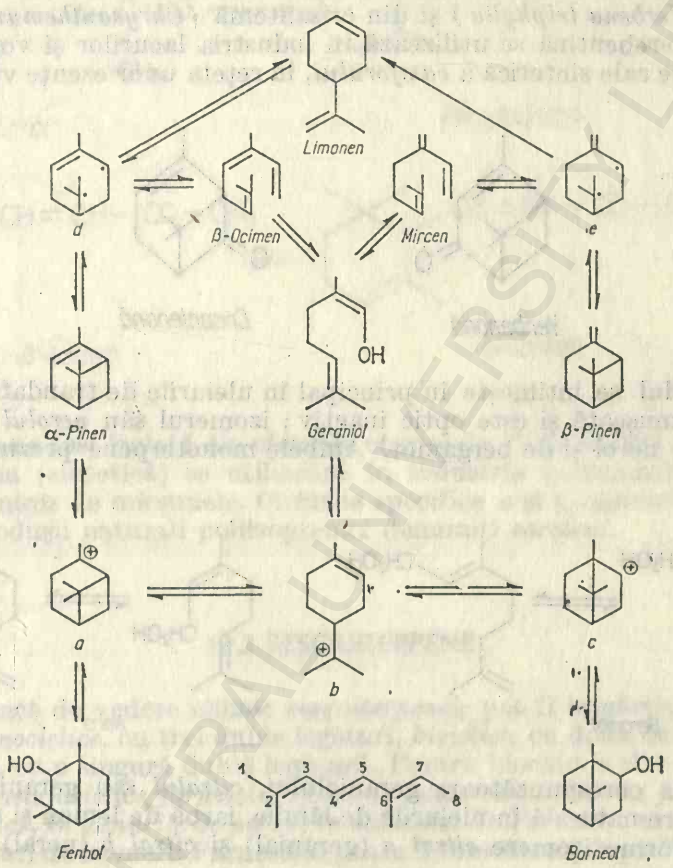
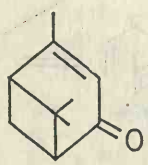


Fig. 12.1. — Interrelaţiile posibile între diferite monoterpene în cursul reacţiilor de biogeneză. Compuşii intermediari (*a*—*e*) preced formarea α- şi β-pinenului, a borneolului şi fenholului şi presupun procese de izomerizare şi de deschidere a ciclului α-pinenului şi β-pinenului. În centrul figurii, jos, este redată numerotarea atomilor de carbon în terpenele aciclice.

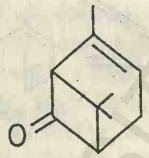
această clasă de terpene fac parte α şi β-*pinenul, geranionul, fenholul, borneolul, mircenul, ocimenul, limonenul,* β-*felandrenul* ş.a.m.d., care rezultă în principal din geraniol prin ciclizări de diferite tipuri (v. fig. 12.1) catalizate, probabil, de enzime şi prin izomerizarea produsului iniţial format sau prin deschiderea ciclurilor.

Acimenul poate izomeriza la rîndul lui în *aloocimen* în care cele trei duble legături sînt conjugate, iar configurația este $\Delta^{4,5}$ *trans*-$\Delta^{6,7}$-*trans* sau în izomerul geometric al acestuia *neoaloocimenul* cu configurația $\Delta^{4,5}$-*trans*-$\Delta^{6,7}$-*cis*.

α și β-Pinenul se întîlnesc în uleiurile eterice, în special în *uleiul de terebentină* obținut prin distilarea cu vapori de apă a cojii diverselor specii de pin. Rășina obținută după distilare este *colofoniul*. Unii derivați oxigenați ai pinenului se întîlnesc în stare naturală și au fost izolați din verbină *(Verbena triphylla)* și din crisantemă *(Chrysanthemum sinense)*. Uleiul de terebentină se utilizează în industria lacurilor și vopselelor, în obținerea pe cale sintetică a *camforului*, în rețeta unor esențe vegetale etc.

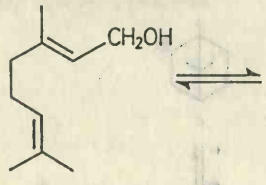


Verbenonă

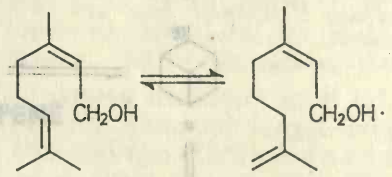


Crisantenonă

Geraniolul se întîlnește în principal în uleiurile de trandafir, de citronela și de mușcată și este optic inactiv ; izomerul său *nerolul* se găsește în uleiul de nerol și de bergamot. Ambele monoterpene prezintă izomeri *cis-trans* :

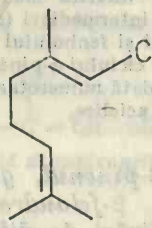


Geraniol

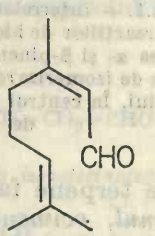


Nerol

Aldehida corespunzătoare geraniolului, *citralul* sau geranialul se găsește în stare naturală în uleiurile de lămîie, iarbă de lemon și se prezintă sub două forme izomere *citral a* (geranial) și *citral b* (neral)

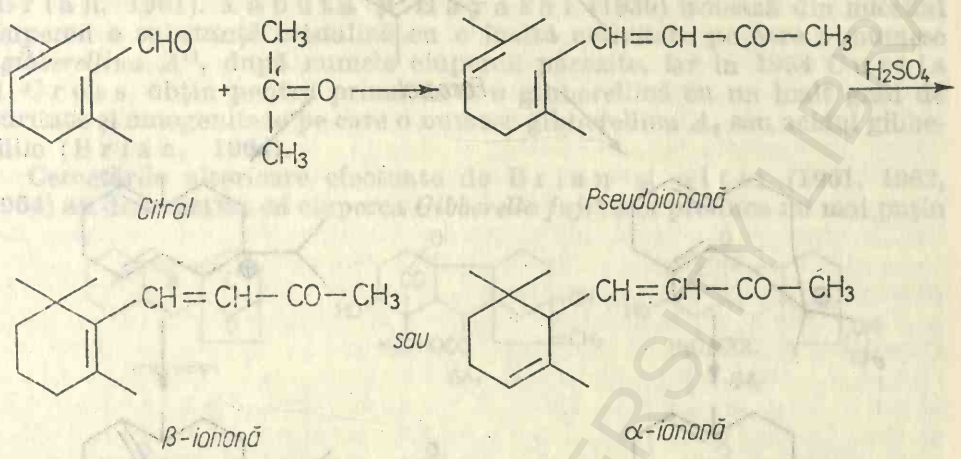


Citral a
(geraniol: trans)



Citral b
(neral: cis)

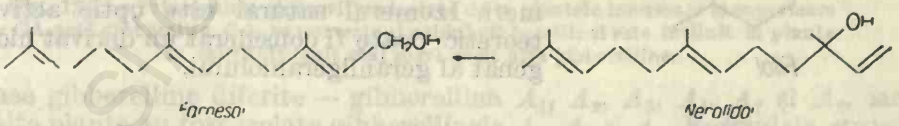
Citralul în mediu alcalin condensează cu acetona cu formare de pseudoionone izomere, iar acestea în prezența acidului sulfuric dau amestecuri de α și β-*iononă*:



β-*Ionona* a fost izolată din uleiurile eterice de *Viola odorata* și împreună cu α-ionona (sintetică) se utilizează în industria parfumurilor, ambele avînd un miros de micșunele. Ciclurile specifice α și β- ononelor se întîlnesc în produșii naturali poliizoprenici denumiți *caroteni*.

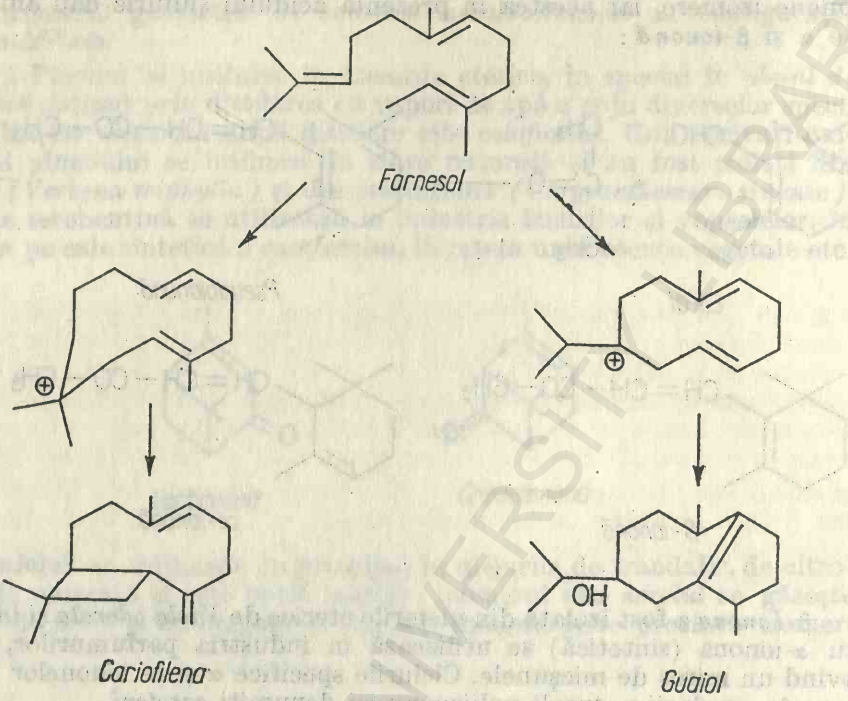
12.3 SESQUITERPENE

Din punct de vedere chimic *sesquiterpenele* pot fi împărțite în *sesquiterpene monociclice*, cu trei duble legături, *biciclice*, cu două duble legături și *triciclice*, cu o singură dublă legătură. Pentru biochimie sînt importante *sesquiterpenele aciclice farnesolul* și *nerolidolul*, răspîndite în *florile de tei*, *de mărgăritar*, *în uleiurile de neroli*, *în balsamul de Peru* etc., unde se găsesc ca amestecuri de izomeri. Farnesolul poate fi considerat, după R u z i c k a, o sesquiterpenă alcătuită din trei unități izoprenice și se poate forma și din nerolidol dacă acesta este încălzit în prezența anhidridei acetice:



Farnesolul prin ciclizare poate forma *bisabolen guaial* (alcool extras și din lemnul de guaiac, *Burnesia sarmienti*) sau *cariofilenă* întîlnită în uleiul de cuișoare (*Eugenia caryophylatta*). În principiu, reacțiile de cicli-

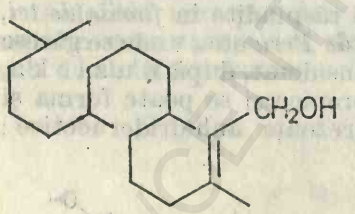
zare a farnesolului pot fi scrise astfel :



Farnesolul sub forma radicalului farnesil intră în structura vitaminelor *K*.

12.4 DITERPENE

Diterpenele se obţin sub forma unor uleiuri vîscoase prin extracţia diferitelor materiale vegetale cu diverşi solvenţi sau prin distilarea cu vapori de apă. Din punct de vedere biochimic cea mai importantă diterpenă este *fitolul*, care în natură nu se întîlneşte în stare liberă ci în structura clorofilei şi a *vitaminelor E şi K*. Fitolul este un alcool superior nesaturat care are doi atomi de C asimetrici şi se poate prezenta sub forma mai multor stereoizomeri. Izomerul natural este optic activ şi teoretic poate fi considerat un derivat hidrogenat al geranilgeraniolului.



Fitol

12.5 GIBBERELLINE

Diterpenii pot cicliza şi în aceast caz produsele rezultate pot fi cu greu identificate ca provenind de la terpene. Aşa este, de exemplu, cazul *gibberellinelor*, un grup de substanţe care controlează creşterea plantelor şi

a fost descoperit de Kurosawa (1926) în extractul din miceliul ciupercii inferioare *Gibberella fujikuroi* care parazitează plantele de orez. Miceliul acestei ciuperci invadează vasele conducătoare ale plantelor de orez, determină o alungire exagerată a tulpinilor și etiolarea frunzelor. (Brian, 1961). Yabuta și Hayashi (1939) izolează din miceliul ciupercii o substanță cristalină cu o înaltă activitate pe care o numesc „*gibberellina A*", după numele ciupercii parazite, iar în 1954 Curtis și Cross obțin pentru prima dată o gibberellină cu un înalt grad de puritate și omogenitate pe care o numesc gibberellina A_3 sau acidul gibberillic (Brian, 1964).

Cercetările ulterioare efectuate de Brian și alții (1961, 1962, 1964) au demonstrat că ciuperca *Gibberella fujikuroi* produce nu mai puțin

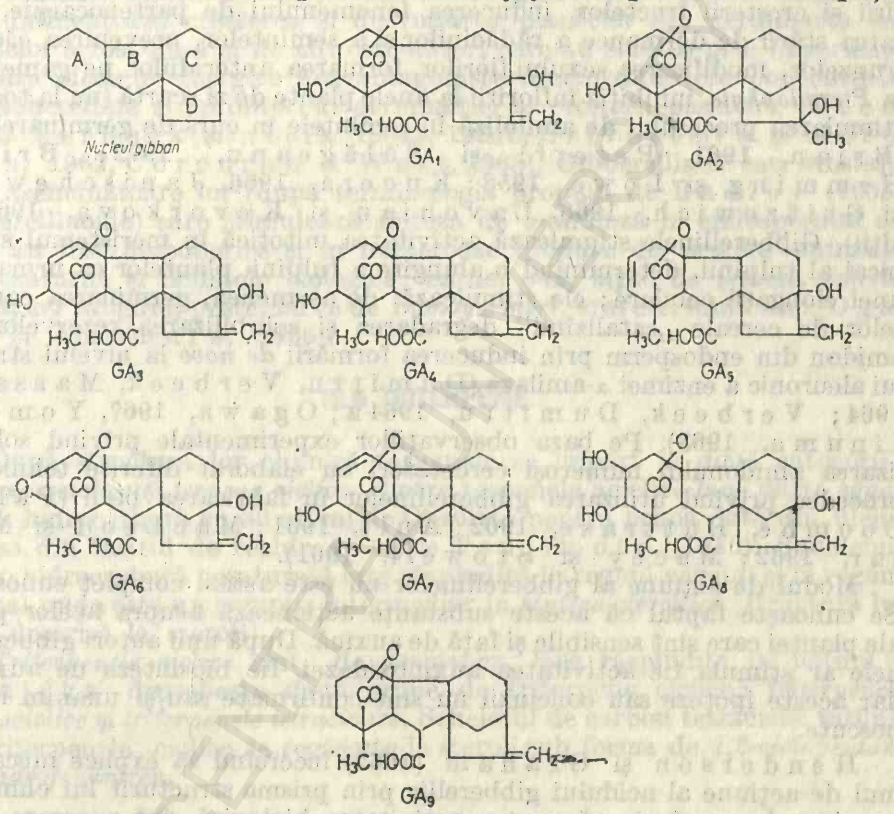


Fig. 12.2. — Principalele gibberelline izolate de la plantele inferioare și superioare GA-acid gibberellic. GA_3 se numește și acidul gibberellic și este întîlnit în plante în cantități mult mai mari decît alte gibberelline.

de șase gibberelline diferite — gibberellina A_1, A_2, A_3, A_4, A_7 și A_9, iar din alte plante au fost izolate gibberellinele A_5, A_6 și A_8. Formulele structurale ale gibberellinelor enumerate sînt redate în figura 12.2. După cum se vede ele sînt diterpenoide tetraciclice derivate de la sistemul ciclic denumit *gibban*. Pentru notarea diferitelor gibberelline se folosesc majusculele GA prevăzute cu un indice numeric. Preparatele obținute pe cale industrială sînt amestecuri, în proporții diverse, de diferite gibberelline.

Gibberellinele și substanțele asemănătoare lor sau gibberellinoide sînt răspîndite în lumea vegetală, fiind localizate în cele mai diferite părți ale plantelor sau în semințele și fructele acestora. Cantitatea de acid gibberellic în semințele de *Phaseolus* este de 100 ori mai mare decît în țesuturile vegetative (Radley, 1958). Unele specii de plante pot sintetiza mai multe gibberelline, cum este cazul la *Echinocystis macrocarpa* în semințele căreia au fost izolate cinci gibberelline — GA_1, GA_3, GA_4, GA_7 și un GA necunoscut (Elson, Jones, MacMillan, Suter, 1964) sau al semințelor de *Phaseolus multiflorus* și *Phaseolus sp. var. Meteor* care conțin GA_1, GA_5, GA_6 și GA_8 (V. Radley, 1958).

Gibberellinele au asupra plantelor numeroase efecte stimulatoare concretizate în stimularea creșterii tulpinii și a frunzelor, stimularea înfloririi și creșterii fructelor, inducerea fenomenului de partenocarpie, sistarea stării de dormance a rădăcinilor și a semințelor, prevenirea căderii frunzelor, modificarea sexului florilor, formarea anteridiilor pe gametofit la *Pterydophyte*, inhibiția înfloririi la unele plante de zi scurtă (nu la toate), stimularea procesului de amiloliză în semințele în curs de germinare etc. (Brian, 1961, Peterfi și Sălăgeanu, 1972; Brian, Hemming și Lowe, 1958; Kucera, 1966, Janischewski și Gritzewich, 1966, Lavchian și Kevorkova, 1963 și alții). Gibberellinele stimulează activitatea mitotică în meristemul subapical al tulpinii, determinînd o alungire a tulpinii plantelor ca urmare a unei elongații celulare; ele stimulează, de asemenea, germinarea cariopselor de cereale „catalizînd" degradarea și solubilizarea rezervelor de amidon din endosperm prin inducerea formării *de novo* la nivelul stratului aleuronic a enzimei α-amilaza (Dumitru, Verbeek, Massart, 1964; Verbeek, Dumitru, 1964 a; Ogawa, 1967, Yomo și Iinuma, 1963). Pe baza observațiilor experimentale privind solubilizarea amidonului numeroși cercetători au elaborat diferite tehnici și procedee privind utilizarea gibberellinelor în fabricarea berii (Paleg, Coombe, Buttrase, 1962; Ault, 1961; MacLeod și Millar, 1962; Macey și Stowell, 1961).

Modul de acțiune al gibberellinelor nu este astăzi complet cunoscut. Se cunoaște faptul că aceste substanțe acționează asupra acelor părți ale plantei care sînt sensibile și față de auxină. După unii autori gibberellinele ar stimula fie activitatea auxinoxidazei, fie biosinteza de auxină, dar aceste ipoteze sau concluzii nu sînt confirmate sau/și unanim recunoscute.

Henderson și Graham (1962) încercînd să explice mecanismul de acțiune al acidului gibberellic prin prisma structurii lui chimice, au ajuns la concluzia că pentru activitatea biologică sînt necesare prezența nealterată a ciclului A și a grupării lactonice, grupările hidroxil și grupării din poziția 3 a ciclului A care nu poate fi substituită fără diminuarea sau pierderea completă a activității biologice. Ei presupun că ciclul A poate suferi, la cald și în mediu alcalin, o rearanjare alilică însoțită de trecerea lui într-o stare inactivă.

Pe de altă parte, este interesant de reținut un fapt de o importanță definitorie pentru activitatea biologică a gibberellinelor: în testele biologice utilizate pentru determinarea activității lor sau în experiențele efectuate pe diferite organe de plante, diversele preparate de gibberelline au

o activitate relativă fluctuantă, ceea ce înseamnă că micile diferenţe structurale redate în figura 12.2 au o mare însemnătate pentru activitatea gibberellinelor şi pentru specificitatea lor.

După alţi autori (V a r n e r şi c o l a b., 1965) gibberellinele ar acţiona la nivelul genelor producînd fenomenele specifice de represie sau depresie genetică. V a r n e r şi colab. presupun că biosinteza *de novo* a α-amilazei în endospermul de orz este corelată cu biosinteza *m*RNA, care în cazul acţiunii gibberellinelor este blocată numai după 7—8 ore de la începerea tratamentului cu *actinomicină D*. P e t e r f i şi S ă l ă g e a n u (1972) văd probabil acest mecanism de acţiune al gibberellinelor datorită marii lor diversităţi structurale : „*numai gibberellinele posedă o astfel de diversitate, necesară activităţii specifice a genelor*".

Problema relaţiilor funcţionale dintre gibberelline şi alte substanţe care influenţează creşterea şi dezvoltarea plantelor sau germinarea seminţelor a fost pusă şi de alţi cercetători care au stabilit prin experienţe *in vitro* efectele sinergice sau antagoniste dintre diferitele concentraţii de gibberelline şi inhibitori ai germinaţiei şi creşterii plantelor (V e e n, 1963, V e r b e e k şi a l ţ i i, 1964a, 1964b, S r i v a s t a v a şi M e r e d i t h, 1962, C o r c o r a n şi W e s t, 1968). Gibberellinele sau substanţele asemănătoare lor (după terminologia propusă de R a d l e y (1956) gibberellinoide) care stimulează sinteza de α-amilază în endospermul de orez au fost descoperite şi în numeroase produse de origine animală, în ţesuturile şi lichidele biologice : carne, ouă, lapte de femeie, salivă, urină, ser sanguin, peşte, larve de *Bombyx mori*, crevete, midii etc. (O g a w a şi I m a m u r a, 1966).

12.6 TRITERPENE

După structura lor chimică terpenele se împart în două categorii : *terpene aciclice* şi *terpene ciclice*. Dintre terpenele aciclice face parte *squalenul*, hidrocarbură cu 30 atomi de C izolată pentru prima dată din uleiul extras din ficatul de rechin de către T s u j i m o t o (1916). Squalenul este o hidrocarbură nesaturată larg răspîndită în regnul vegetal şi în regnul animal unde este un compus intermediar în *sinteza sterolilor* (structura lui este descrisă la steroli).

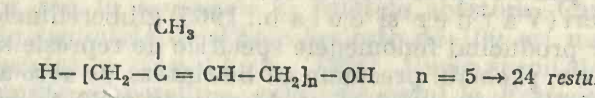
Triterpenele ciclice sînt, de asemenea, larg răspîndite în natură şi R u z i č k a deosebeşte două grupe de triterpene ciclice : *triterpenele pentaciclice* şi *triterpenele tetraciclice*. Scheletul de carbon tetraciclic întîlnit în triterpenele ciclice se regăseşte la steroli sub forma de *1,2-ciclopentanperhidrofenantren*.

12.7 POLIPRENOLII

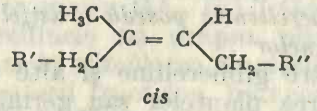
Poliprenolii sînt substanţe naturale, răspîndite în cantităţi infime în lumea animală şi vegetală *. Din punct de vedere chimic poliprenolii

* Denumirea de poliprenoli a acestei clase de compuşi naturali provine de la termenul poli-izopren-ol. Nomenclatura lor chimică este redată detaliat în lucrarea lui H e m m i n g (1974). V. şi lucrarea de sinteză a lui O s b o r n (1969)

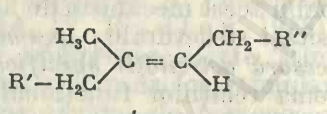
sînt alcooli primari în structura cărora se întîlnesc resturi de izopren. În funcție de proveniența lor, poliprenolii conțin între 5 și 24 resturi de izopren și formula lor generală poate fi redată ast el :



Resturile de izopren din molecula unui poliprenol pot avea configurație *cis* sau *trans*, toți poliprenolii naturali avînd structuri fie *trans-trans*, fie *cis-trans*.

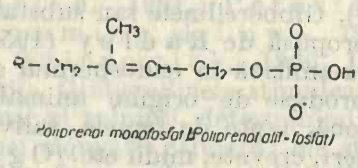


cis

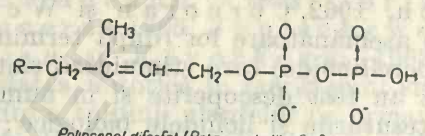


trans

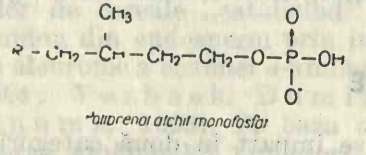
Poliprenolii *cis-trans* se întîlnesc în organisme sub formă de mono- și di-fosfați, care în funcție de prezența sau absența unităților izoprenice pot fi alil-fosfați sau alchil-fosfați. Alil- și alchil-fosfații pot fi glicozilați



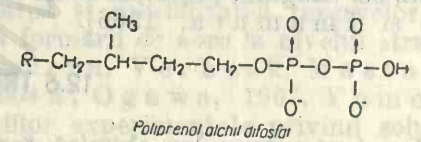
Poliprenol monofosfat (Poliprenol alil-fosfat)



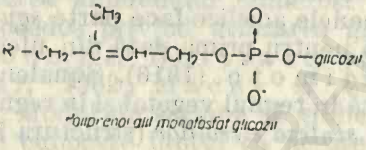
Poliprenol difosfat (Poliprenol alil difosfat)



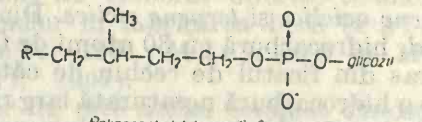
Poliprenol alchil monofosfat



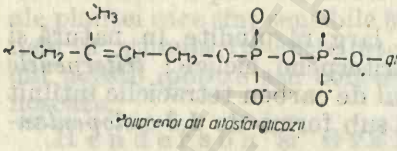
Poliprenol alchil difosfat



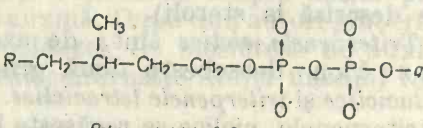
Poliprenol alil monofosfat glicozil



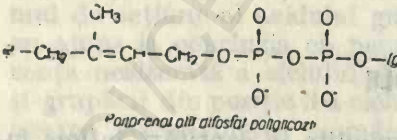
Poliprenol alchil monofosfat glicozil



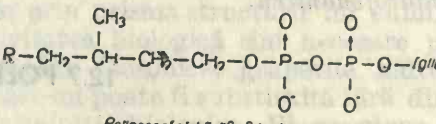
Poliprenol alil difosfat glicozil



Poliprenol alchil difosfat glicozil



Poliprenol alil difosfat poliglicozil



Poliprenol alchil difosfat poliglicozil

Fig. 12.3. — Structura și nomenclatura poliprenolfosfaților și derivaților lor glicozilați. R — catena poliizoprenoidică cu 5 — 24 resturi de izopren, iar *n* — numărul de resturi glicozil.

și atunci dau naștere la alil-monofosfat glicozil, alil-difosfat glicozil sau alil-difosfat (poli)glicozil și respectiv la alchil-monofosfat glicozil și alchil-difosfat glicozil (fig. *12.3*).

Stabilirea structurii chimice a poliprenolilor naturali și derivaților lor a fost realizată prin spectroscopie de masă, rezonanță magnetică nucleară și spectroscopie în infraroșu, precum și prin obținerea de poliprenoli fosfați radioactivi, cu ajutorul preparatelor acelulare obținute din *Salmonela newington* sau în culturile de *Phytophtora cactorum*, cînd în calitate de precursori radioactivi s-au folosit izopentenil pirofosfatul, farnezil pirofosfatul și respectiv mevalonatul.

Poliprenolii în stare liberă au fost întîlniți numai la cîteva bacterii. De regulă, poliprenolii vegetali și animali se întîlnesc în stare fosforilată sau esterificați cu acizii grași cu catenă lungă de atomi de carbon. L e l o i r și colab. (1972) ** au arătat că poliprenolii sînt distribuiți în celulă în cantități mai mari în nucleu, aparatul G o l g i și în reticulul endoplasmatic rugos; în concentrații mai mici se găsesc, în ordine descrescîndă în membrana plasmatică, mitocondrii și în reticulul endoplasmatic neted.

12.8 STEROIZI ȘI LIPIDE IZOPRENICE

Steroizii alcătuiesc o clasă de compuși naturali larg răspîndiți în regnul animal și vegetal care cuprinde *hormonii secretați de glandele sexuale, de partea corticală a glandei suprarenale, de placentă, precum și substanțe care nu au activitate hormonală*, de exemplu, *colesterolul și acizii biliari, alcaloizii steroidici, saponinele, digitaloidele* ș.a. După numărul total al atomilor de C din moleculă steroizii pot fi clasificați astfel:

— steroizii C_{17}, care derivă de la *gonan* și nu au substituienți la atomii de carbon C_{10}, C_{13} și C_{17};

— steroizii C_{18}, au ca nucleu de bază *oestranul* și o grupare metil în poziția C_{13}; din această categorie fac parte oestrogenii naturali;

— steroizii C_{19}, au ca nucleu de bază *androstanul*, adică ciclul gonan în care hidrogenul este substituit în pozițiile C_{10} și C_{13} cu grupări metil; din această categorie fac parte toți hormonii androgeni naturali;

— steroizii C_{21}, derivați de la *pregnan*, adică de la ciclul gonan care este substituit în C_{10} și C_{13} cu grupări metil, iar la C_{17} cu o catenă laterală alcătuită din doi atomi de carbon; din această categorie fac parte hormonii corticosteroizi;

— steroizii C_{24}, derivați de la *colan*, adică de la ciclul gonan, care are în pozițiile C_{10} și C_{13} două grupări metil, iar la C_{17} o catenă laterală ramificată, alcătuită din cinci atomi de carbon; din această categorie fac parte majoritatea acizilor biliari naturali;

— steroizii C_{27}, substanțe derivate de la *colestan*, adică de la ciclu gonan care este metilat în C_{10} și C_{13}, iar în poziția C_{17} are o catenă laterală ramificată, alcătuită din opt atomi de carbon; din această categorie fac parte zoo- și fitosterolii.

** v. D u l l n e r și alții (1972)

Alți steroizi naturali derivă de la substanțe de bază denumite *ergostan* (24-metil-5-α-colestan), *lanostan* (4,4,14 α-trimetil-5-α-colestan), *stigmastan* (24-etil-5α-colestan). În figura 12.4. sînt reprezentate substanțele de bază de la care derivă principalii steroizi naturali.

Nucleul de bază și posibilitățile sale de izomerie. Nucleul de bază al moleculei steroizilor se compune din trei hexacicluri (*A*, *B*, *C*,

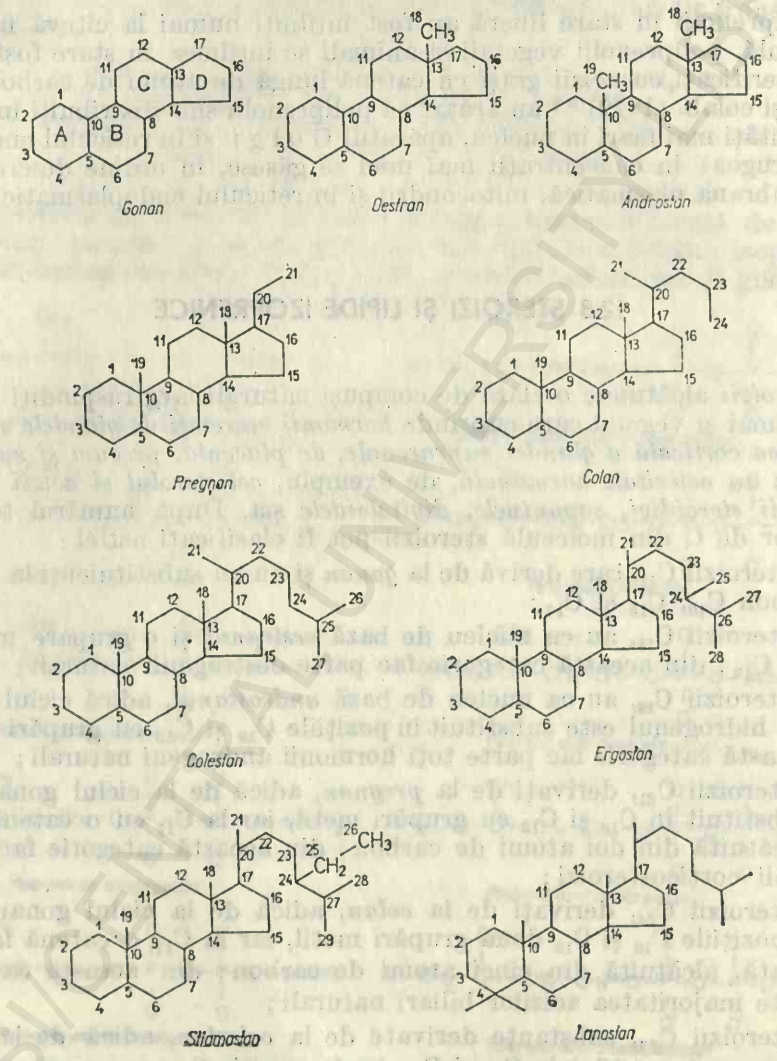
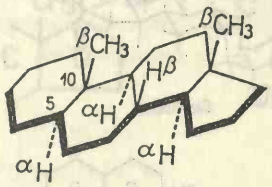


Fig. 12.4. — Structura compușilor de bază de la care derivă principalii steroizi naturali.

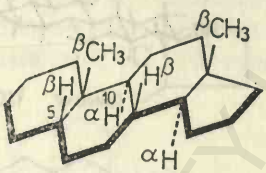
figura *12.4*) și un pentaciclu (*D*). Inelele formează anumite suprafețe, făcînd posibilă o izomerie *cis-trans*. Fiecare inel ciclohexanic are configurația de „scaun", iar toți atomii care leagă două cicluri sînt asimetrici.

Substituirea hidrogenului la un atom de carbon cu o funcțiune monovalentă introduce în moleculă posibilitatea unei asimetrii suplimentare.

Inelele *B*, *C* și *D* sînt prezente aproape în toți steroizii naturali în pozițiile *trans* și numai între inelele *A* și *B* se pot observa variații ale poziției legăturii. Acest lucru este evident în cazul androstanului la care atomii de hidrogen și grupările metil alternează regulat deasupra și dedesubtul planului inelelor (5-α-androstan), configurație *trans* și 5-β-androstan, configurație *cis*):

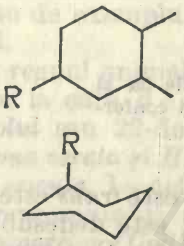


5α-Androstan

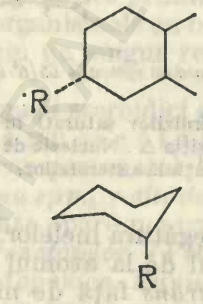


5β-Androstan (Etiocolan)

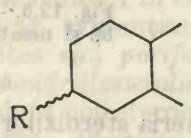
Pozițiile grupărilor laterale, a atomilor de hidrogen, a grupărilor hidroxil și a catenelor laterale, pe baza unei convenții unanim admise sînt raportate întotdeauna la poziția grupării $-CH_3$ de la atomul de C_{10}. Cînd grupările sînt situate deasupra planului inelelor se vorbește de poziția β; în acest caz gruparea se află în poziția *cis* față de $-CH_3$ din C_{10} și se va scrie în formule printr-o linie de valență neîntreruptă. Cînd gruparea sau grupările (substituenții) se află în poziție *trans* față de metilul din C_{10} și sînt proiectate dedesubtul planului inelelor, poziția este α și se scrie printr-o linie întreruptă. Cînd poziția substituentului este necunoscută configurația se notează printr-o linie ondulată și este desemnată prin litera grecească ξ



Configurație β



Configurație α



Configurație ξ

Aceste considerațiuni privind configurația stereochimică a steroizilor sînt importante deoarece activitatea lor biologică, în primul rînd a hormonilor de natură steroidică, este strîns legată de izomeria lor.

Conformația steroizilor. Inelele ciclohexanice nu sînt coplanare ci apar în așa-numita *formă scaun*, în care cei doi atomi de carbon din poziția simetrică sînt situați în sus și în jos față de planul nucleului. Substi-

tuenţii pot fi situaţi fie ecuatorial, adică lateral, faţă de planul nucleului, fie axial, adică perpendicular pe acest plan. În acest fel devine posibilă apropierea unor grupări funcţionale în *trans*, sau a unor substituenţi, în poziţia *cis*. Un exemplu ilustrativ în acest sens îl constituie conformaţia *trans* şi *cis* a colesterolului şi coprostanolului, care poate da o imagine reală asupra „volumului" acestor compuşi (fig. 12.5).

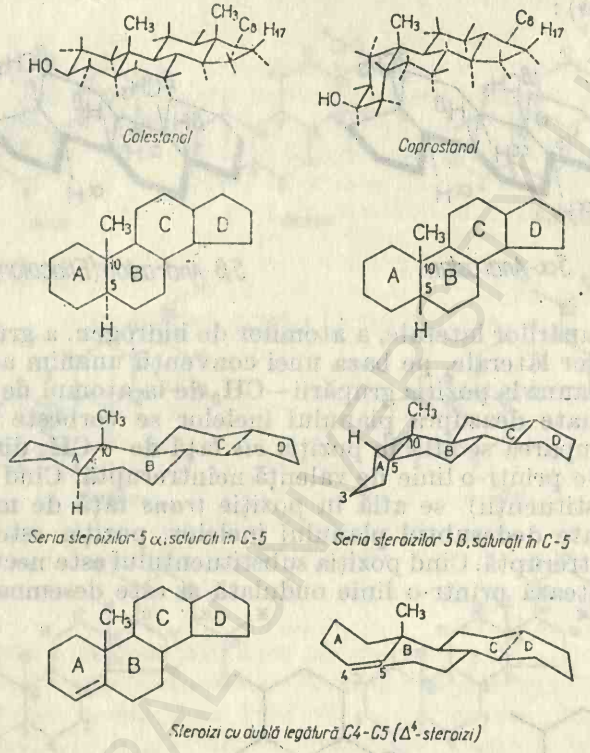
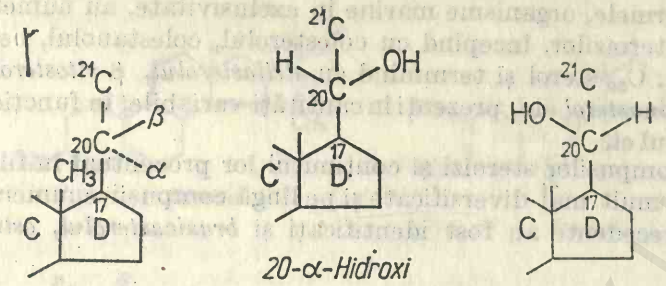


Fig. 12.5. — Seria steroizilor saturaţi în poziţiile 5α şi 5β şi nesaturaţi în poziţia Δ. Nucleele de bază şi conformaţia spaţială a steroizilor.

Izomeria steroizilor în care legătura inelelor A : B este *trans* este desemnată „5α", deoarece hidrogenul de la atomul de C_5 este dedesubtul planului moleculei şi în poziţiile *trans* faţă de metilul din C_{10}, care în toţi steroizii naturali este situat în poziţie β. În seria „5β" joncţiunea inelelor A : B este *cis*. Această situaţie este valabilă pentru toţi steroizii în care atomul C_5 este saturat. În steroizii la care atomul de carbon C_5 prezintă o dublă legătură (C_4—C_5 sau C_5—C_6) absenţa hidrogenului împiedică apariţia unei stereoizomerii între inelele A : B (fig. 12.5).

Simbolurile α şi β sînt folosite pentru precizarea stereoizomeriei la nivelul oricărui atom de carbon asimetric. Astfel, de exemplu, dacă C_{21} se deplasează în spatele planului, raportat la atomul C_{20}, grupările funcţionale de la atomul C_{20} se vor situa fie în dreapta fie în stînga acestuia.

În acest caz gruparea funcțională situată în stînga, în planul formulei va fi în poziția β, iar cea situată în dreapta va fi în poziția α:



20-α-Hidroxi

12.9 STEROLII

Biochimia sterolilor a constituit în decursul numeroșilor ani, în special în decadele II—V ale secolului XX, un puternic punct de atracție pentru numeroși cercetători. Unii dintre ei, de exemplu, B l o c h, B e r g m a n n, V a n g h e l o v i c i și a l ț i i și-au dedicat întreaga activitate științifică acestor compuși larg răspîndiți atît la plante cît și la animale. B e r g m a n n (1962) și M i l l e r (1962) au încercat să alcătuiască o taxonomie biochimică pe baza sterolilor întîlniți la diferiți reprezentanți ai regnelor animal și vegetal, deși astăzi ne apare deosebit de clar faptul că o asemenea clasificare se poate realiza numai pe baza unei coroborări multiple a indicilor biochimici cu alte caractere morfoanatomice ale speciilor. Pe de altă parte, rămîne perfect valabilă constatarea lui A u s t i n (1970) că în regnul animal reprezentanții cu o organizare primitivă conțin o gamă largă de compuși steroidici în timp ce organismele cu o organizare superioară, unele vertebrate de exemplu, conțin un singur reprezentant al sterolilor — *colesterolul.*

În regnul animal compușii steroidici au fost identificați în clasa spongierilor la care B e r g m a n n și c o l a b. (1964) au evidențiat *neospongosterolul* sau 22-dehidrocampestanolul la Suberites sp., *poriferasterolul, la Cliona cerata și Haliclona spp.*, γ-*sitosterolul* și *chondrillasterolul la Chondrilla nucula.* La celenterate apare pentru prima dată colesterolul, care la unii reprezentanți ai *sifonoforelor (Velella spirans, Physalia physalis)* și *antozoarelor (Calliactis Japonica, Eunicea succinea)* este singurul compus de natură steroidică. Celenteratele conțin steroli cu un număr de atomi de C ce variază între C_{27} și C_{30}—C_{31} și pe lîngă (sau în afară de) colesterol au în structura lor *gorgosterol* (C_{30}—C_{31}), *24-metilencolesterol, chalinasterol,* β-*sitosterol ș.a.*

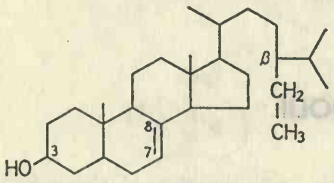
De remarcat faptul că celenteratele conțin aprox. 33% din greutatea lor uscată lipide, care, de regulă, sînt sau pot fi bogate în steroli. Sinteza și metabolismul sterolilor la ord. *Poriferae* și *Caelenteratae* sînt necunoscute.

W o o t t o n și W r i g h t (1962) plecînd de la constatările anterioare că anelidele conțin 0,2% steroli (raportat la greutatea uscată) au reușit să

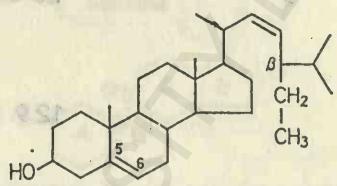
demonstreze că *Nereis diversicolor*, *Nereis virens*, *Arenicola marina* și alți viermi sintetizează un 3-β-hidroxisterol *via* acid mevalonic (v. capitolul 18).

Echinodermele, organisme marine în exclusivitate, au numeroși reprezentanți ai steroizilor, începînd cu colesterolul, colestanolul, oestradiolul, progesterona, C_{30}-sterol și terminînd cu *stellasterolul*, *β-sitosterolul*, *crinosterolul*, *α-spinasterol* etc. prezenți în cantități variabile, în funcție de specie sau de arealul ei.

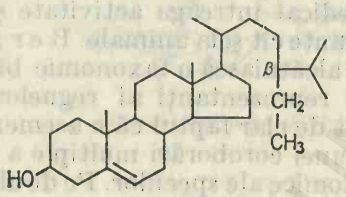
Natura compușilor steroizi și conținutul lor procentual în filumul moluștelor sînt mult mai diversificate și pe lîngă compușii enumerați pentru filumurile precedente au fost identificați și *brasicasterolul*, *ostreasterolul*,



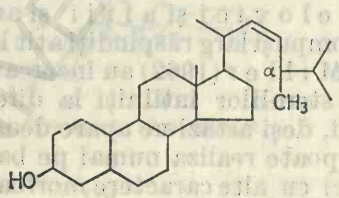
Chondrillasterol



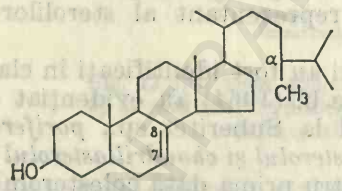
Poriferasterol



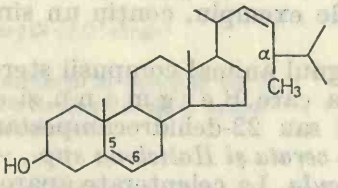
γ-Sitosterol



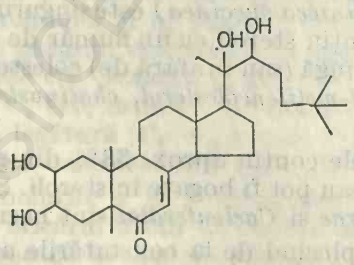
Neospongosterol



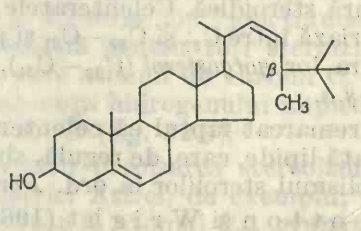
Stellasterol



Pincsterol



Crustecdizona



Brassicasterol

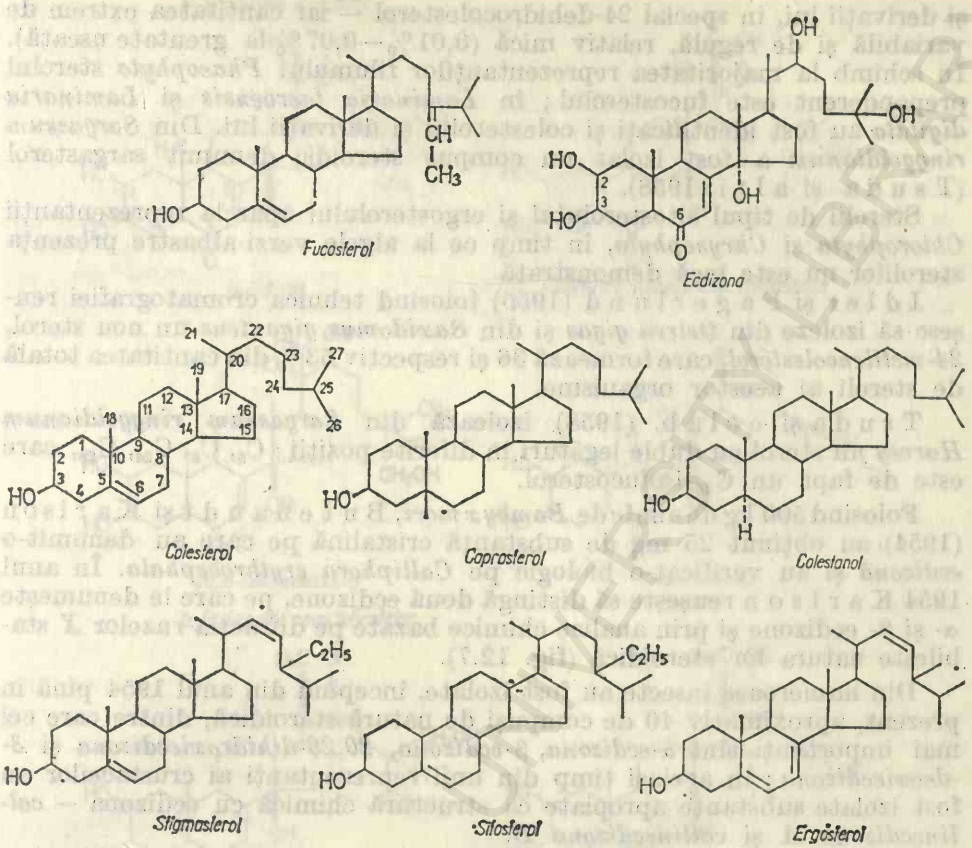


Fig. 12.6. — Principalii steroizi izolați de la diferiți reprezentanți ai regnurilor vegetal și animal.

stigmasterolul, ergosterolul, dehidrocolesterolul, clionasterol, pincsterolul, fucosterolul ș.a. De remarcat faptul că de la *Pinctada martensi* a fost izolat un nou sterol — pincsterolul — care probabil este un C_{24} epimer al brassicasterolului, identificat la crustacei.

Moluștele, în special cele ierbivore, se pare, că sînt capabile să sintetizeze compuși steroizi cu C_{27}, C_{25}, C_{22} din ^{14}C-1-acetat (V. A u s t i n, 1970).

La crustacei steroidul predominant pare a fi colesterolul și derivații lui 7-dehidrocolesterolul, 22-metilencolesterolul, 24-dehidrocolesterolul, colesterolul esterificat. H o r n și a l ț i i (1968) au arătat că *Jasus lalandei* sintetizează un compus steroidic — *20-hidroxiecdizona* sau *crustecdizona* — întîlnit în cantități mai mari la insecte și la unele plante superioare. Biosinteza colesterolului la crustacei se realizează plecîndu-se de la ^{14}C-1-acetat și ^{14}C-2-mevalonat, dar se pare că aceste animale au nevoie și de un aport de steroli exogeni.

În figura 12.6. *a* și *b* sînt redați principalii compuși de natură steroidică întîlniți în regnurile animal și vegetal.

La reprezentanții marini ai filumului *Rhodophyta*, compoziția compușilor steroidici este relativ eterogenă — fucosterol, lanosterol, colesterol

și derivații lui, în special 24-dehidrocolesterol — iar cantitatea extrem de variabilă și de regulă, relativ mică (0,01%—0,07% la greutate uscată). În schimb la majoritatea reprezentanților filumului *Phaeophyta* sterolul preponderent este fucosterolul; în *Laminaria faeroensis* și *Laminaria digitata* au fost identificați și colesterolul și derivații lui. Din *Sargassum ringgoldianum* a fost izolat un compus steroidic denumit sargasterol (Tsuda și alții 1958).

Sterolii de tipul sitosterolului și ergosterolului apar la reprezentanții *Chlorophyta* și *Chrysophyta*, în timp ce la algele verzi-albastre prezența sterolilor nu este încă demonstrată.

Idler și Fagerlund (1955) folosind tehnica cromatografiei reușesc să izoleze din *Ostrea gigas* și din *Saxidomus giganteus* un nou sterol, *24-metilencolesterol*, care formează 36 și respectiv 53% din cantitatea totală de steroli ai acestor organisme.

Tsuda și colab. (1958) izolează din *Sargassum ringgoldianum Harvey* un sterol cu duble legături în diferite poziții: C_5, C_6, C_{24}, C_{28}, care este de fapt un C_{20}-isofucosterol.

Folosind 500 kg de nimfe de *Bombyx mori*, Butenandt și Karlson (1954) au obținut 25 mg de substanță cristalină pe care au denumit-o *ecdizonă* și au verificat-o biologic pe *Calliphora erythrocephala*. În anul 1954 Karlson reușește să distingă două ecdizone, pe care le denumește α- și β- ecdizone și prin analize chimice bazate pe difracția razelor *X* stabilește natura lor steroidică (fig. 12.7).

Din numeroase insecte au fost izolate, începînd din anul 1954 pînă în prezent, aproximativ 40 de compuși de natură steroidică, dintre care cei mai importanți sînt *α-ecdizona*, *β-ecdizona*, *20,26-dihidroxiecdizona* și *3-deoxiecdizona*; în același timp din unii reprezentanți ai crustaceilor au fost izolate substanțe apropiate ca structură chimică cu ecdizona — *callinecdizona A* și *callinecdizona B*.

În 1966, (Nakamishi) au fost izolați din plante peste 30 de compuși organici asemănători sau identici cu ecdizonele care pot determina declanșarea procesului de metamorfoză la insecte (Boid, Rees, Goodwin, 1974). Aceste substanțe au fost denumite *fitoecdizone* și au fost identificate sau separate de la diferiți reprezentanți ai *Pteridophyta*, *Gymnospermae* și *Angiospermae*. Rolul lor la plante rămîne obscur și în prezent este foarte controversat. În figura 12.8 sînt redate formulele structurale ale *rubrosteronului* și *amarasteronului A*. Recent, Boid, Rees și Goodwin (1974) au studiat mecanismul biosintezei *ciasteronei*, hormonul năpîrlirii, care este sintetizat de plantele din familia *Amarantaceae*.

Ecdizonele conțin un număr variabil de atomi de carbon: 19 C—; 21 C—; 27 C—; 28 C—; 29 C-ecdizone; zooecdizonele au de regulă 27 sau 28 atomi de carbon, în timp ce reprezentanții fitoecdizonelor sînt substanțe ce conțin 19, 21, 27, 28 sau 29 atomi de carbon. Ecdizonele au fost sintetizate în laborator prin cîteva procedee de sinteză și structura lor a fost astfel confirmată (Ahrem, Levina, Titov, 1973).

Ecdizona și *ecdipterona* au fost izolate de la diferite insecte *(Bombyx mori, Calliphora erythrocephala, Calliphora stygia, Doryphora decemlineata, Locusta migratoria, Manduca sexta)*, precum și de la unii crustacei *(Callinectea sapidus, Jasus lalandei)*. Extracte cu activitate hormonală au fost

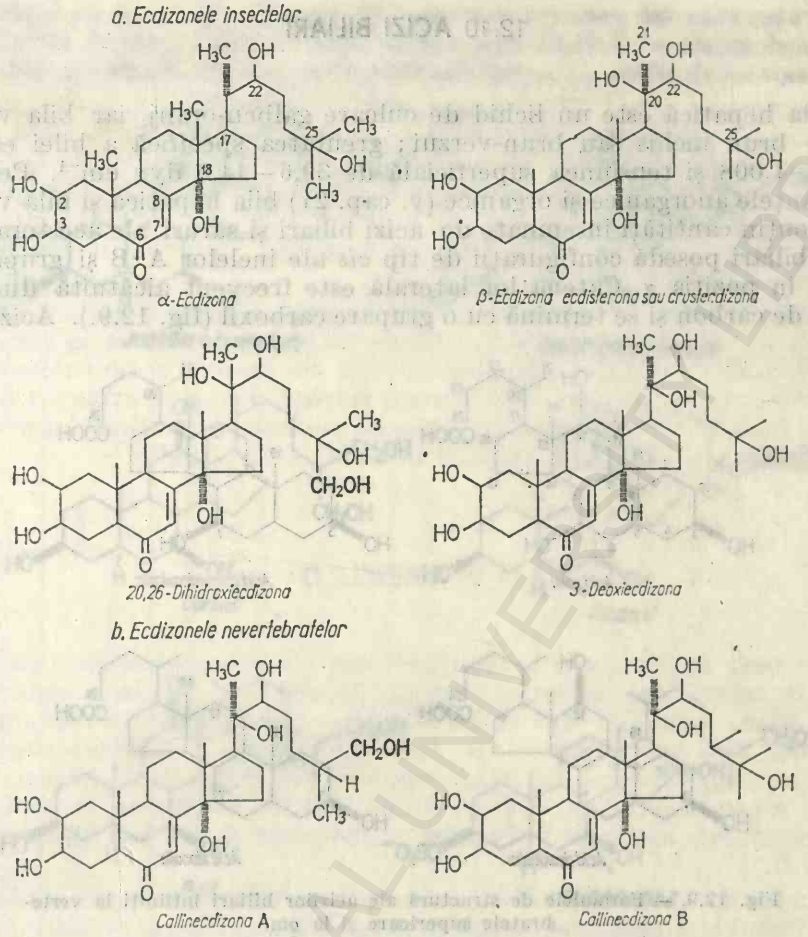


Fig. 12.7. — Formulele structurale ale α- şi β-ecdizonelor.

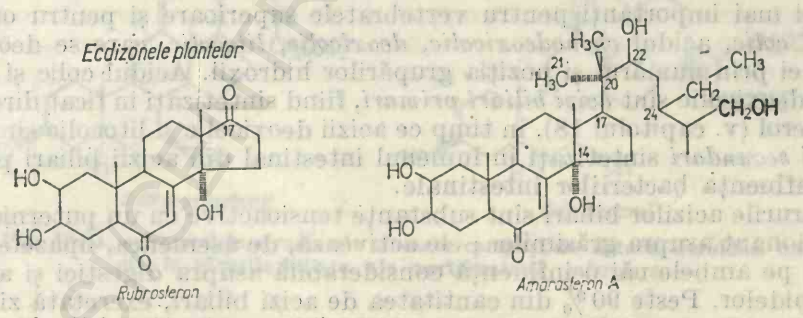


Fig. 12.8. — Structura unor fitoecdizone izolate de la *Pteridophytae*, *Gymnospermae* şi *Angiospermae*.

obţinute şi de la unele moluşte (*Mytilus edulis*, *Australorbia grabatus* etc.). Pentru activitatea ecdizonelor sînt esenţiale lungimea catenei laterale (poziţia 17), prezenţa grupărilor hidroxil şi, în special, a celei din poziţia 22.

12.10 ACIZI BILIARI

Bila hepatică este un lichid de culoare galben-oranj, iar bila veziculară — brun închis sau brun-verzui; greutatea specifică a bilei este de 0,990—1,008 și tensiunea superficială de 39,6—44,0 dyn cm^{-1}. Pe lîngă substanțele anorganice și organice (v. cap. 21) bila hepatică și bila veziculară conțin cantități însemnate de acizi biliari și săruri ale acestora. Toți acizii biliari posedă configurații de tip *cis* ale inelelor A :B și grupări hidroxil în poziția α. Catena lor laterală este frecvent alcătuită din cinci atomi de carbon și se termină cu o grupare carboxil (fig. 12.9.). Acizii bili-

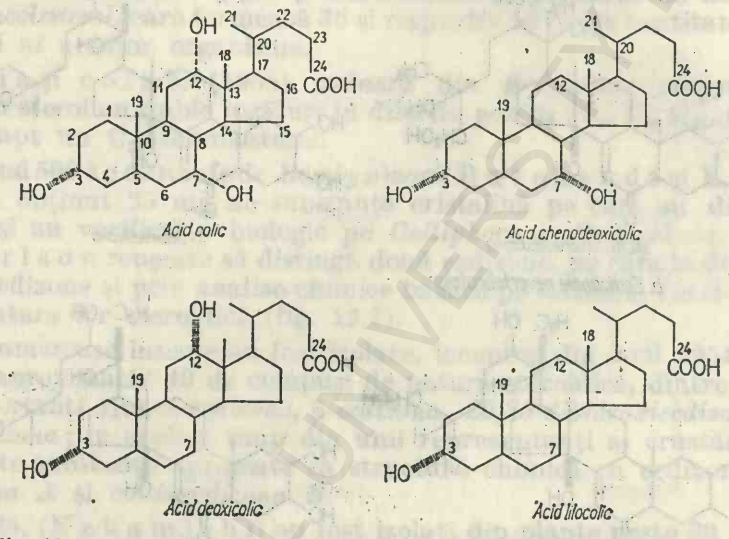


Fig. 12.9. — Formulele de structură ale acizilor biliari întîlniți la vertebratele superioare și la om.

ari cei mai importanți pentru vertebratele superioare și pentru om sînt *acidul colic*, acidul *chenodeoxicolic*, *deoxicolic*, *litocolic*, care se deosebesc între ei prin numărul și poziția grupărilor hidroxil. Acidul colic și acidul chenodeoxicolic sînt *acizi biliari primari*, fiind sintetizați în ficat direct din colesterol (v. capitolul 18), în timp ce acizii deoxicolic și litocolic sînt *acizi biliari secundari* sintetizați în lumenul intestinal din acizii biliari primari sub influența bacteriilor intestinale.

Sărurile acizilor biliari sînt substanțe tensioactive cu un puternic efect emulsionant asupra grăsimilor; ele activează, de asemenea, lipazele, exercitînd pe ambele căi o influență considerabilă asupra digestiei și absorbției lipidelor. Peste 90% din cantitatea de acizi biliari, excretată zilnic în intestin și care constituie aproximativ 20—30 g, este în cazul organismului omenesc resorbită și recirculată în *ciclul enterohepatic*. Metabolismul acizilor biliari la vertebratele superioare și la om este descris în capitolul 18.

La vertebratele primitive, de exemplu, la *Lampetra*, principalul component al sărurilor biliare este disulfatul de *mixinol*, un compus C_{27}. Reprezentanții familiei ciclostomilor conțin un compus C_{24}, deci apropiat ca

structură de acizii biliari ai vertebratelor superioare dar care este prezent sub formă de ester *sulfat de petromizonol* (fig. 12.10.). La elasmobranchiate se întîlnește un alt tip de acizi biliari sub formă de *sulfat de scimnol* și nu-

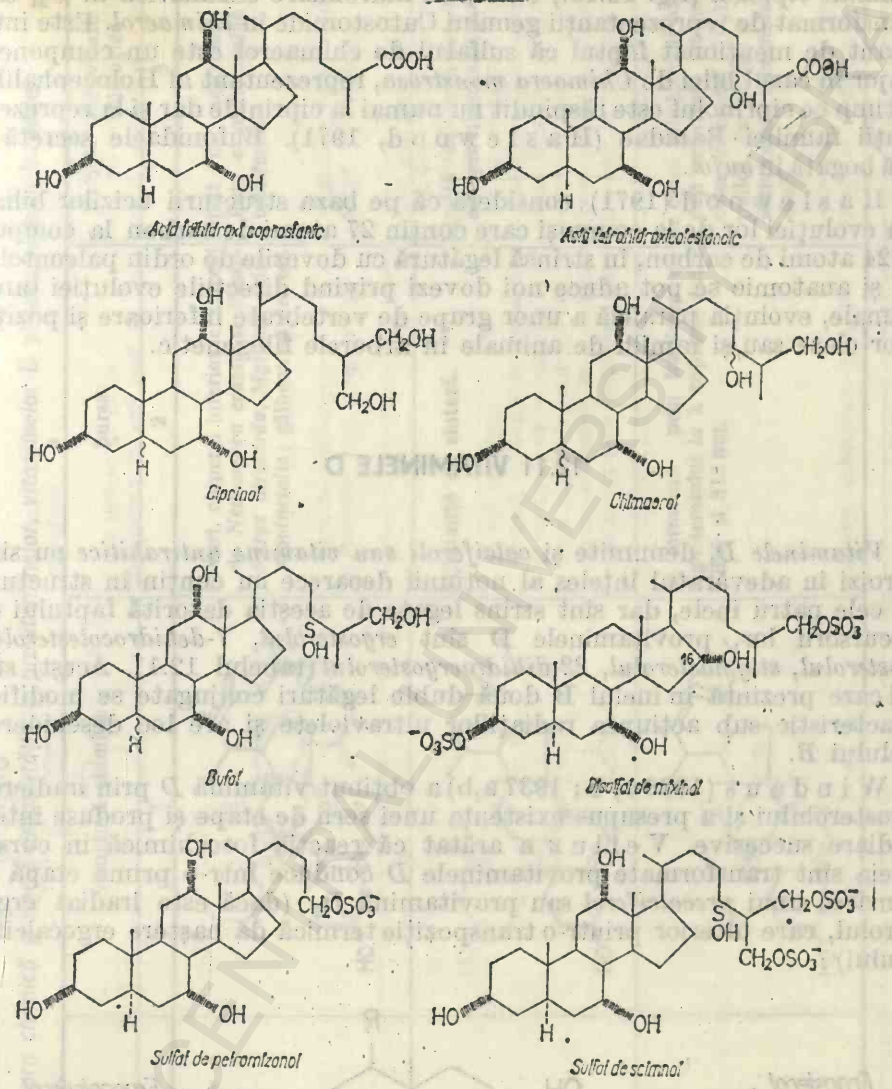


Fig. 12.10. — Formulele structurale ale unor compuși de natură steroidică întîlniți în sărurile biliare ale vertebratelor inferioare.

mai începînd cu teleosteenii se întîlnește acidul taurocolic care este larg răspîndit la vertebrate și la om.

Din bila de *Rana catesbiana*, aligator și crocodil au fost izolate mai multe substanțe care după analiza fizico-chimică s-au dovedit a fi *acid trihidroxicoprostanic* și un compus intermediar în biosinteza acidului colic rea-

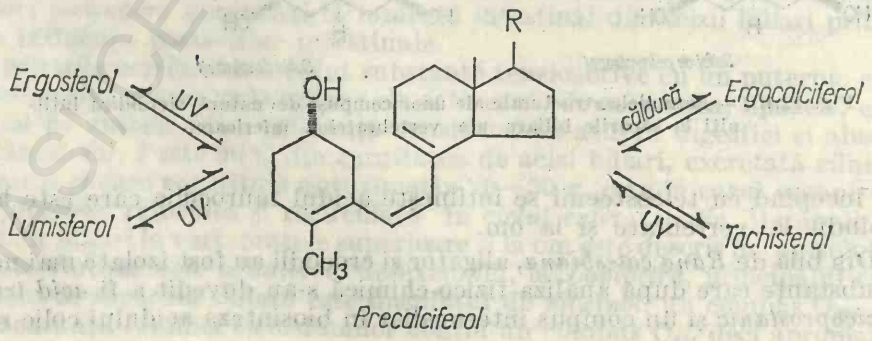
lizată de organismul şobolanului alb şi de om. La *Varanidae* principalul component biliar este *acidul tetrahidroxicolestanoic*, în timp ce bila de *Latimeria chalumnae*, a ciprinidelor şi unor amfibieni conţine acidul biliar denumit *ciprinol* (fig. 12.10.) care prin hidroxilare enzimatică în C_{24} este transformat de reprezentanţii genului Cutostomide în *chimaerol*. Este interesant de menţionat faptul că sulfatul de chimaerol este un component major în cazul bilei de *Chimaera monstrosa*, reprezentant al Holocephalilor în timp ce ciprinolul este răspîndit nu numai la ciprinide dar şi la reprezentanţii familiei Ranidae (H a s l e w o o d, 1971). Bufonidaele secretă o bilă bogată în *bufol*.

H a s l e w o o d (1971) consideră că pe baza structurii acizilor biliari şi a evoluţiei lor de la compuşi care conţin 27 atomi de carbon la compuşi cu 24 atomi de carbon, în strînsă legătură cu dovezile de ordin paleontologic şi anatomic se pot aduce noi dovezi privind direcţiile evoluţiei lumii animale, evoluţia paralelă a unor grupe de vertebrate inferioare şi poziţia unor clase sau/şi familii de animale în arborele filogenetic.

12.11 VITAMINELE D

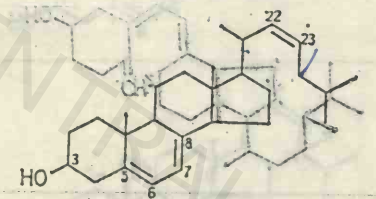
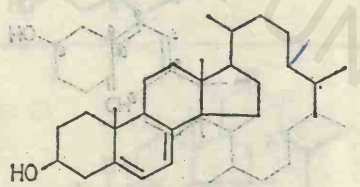
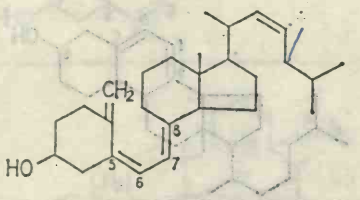
Vitaminele D, denumite şi *calciferoli sau vitamine antirahitice* nu sînt steroizi în adevăratul înţeles al noţiunii deoarece nu conţin în structura lor cele patru inele, dar sînt strîns legate de aceştia datorită faptului că precursorii lor, provitaminele D sînt *ergosterolul, 7-dehidrocolesterolul, sitosterolul, stigmasterolul, 22-dihidroergosterolul* (tabelul 12.1). Aceşti steroli care prezintă în inelul B două duble legături conjugate se modifică caracteristic sub acţiunea radiaţiilor ultraviolete şi are loc deschiderea inelului *B*.

W i n d a u s (1936 a, b ; 1937 a,b) a obţinut vitamină *D* prin iradierea ergosterolului şi a presupus existenţa unei serii de etape şi produse intermediare succesive. V e l l u z a arătat că reacţia fotochimică în cursul căreia sînt transformate provitaminele *D* conduce într-o primă etapă la formarea unui *precalciferol* sau provitamină D_2 (dacă este iradiat ergosterolul, care ulterior printr-o transpoziţie termică dă naştere ergocalciferolului) :



TABELUL 12.1

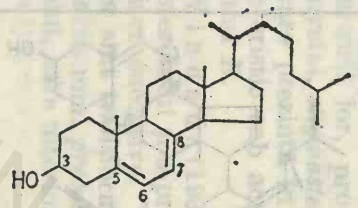
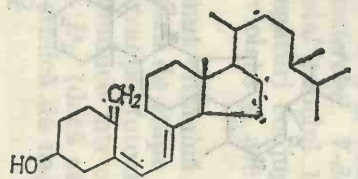
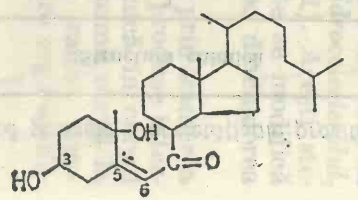
Structura chimică și unele proprietăți ale provitaminelor, vitaminelor D și substanțelor înrudite

Denumire *	Structură chimică	Sursa	Activitate biologică
0	1	2	3
Ergosterol		Levuri, ciuperci inferioare, micelii de *Neurospora crassa* și *Stadybotrys atracorda*, *Mytillus galloprovincialis*; gălbenușul de ou.	Lipsit de activitate biologică. Este o provitamină D_2 (ergocalciferol)
22-Dihidroergosterol		Substanță de sinteză.	Lipsită de activitate biologică; este provitamina D_4.
Ergocalciferol** (vitamina D_2)		Se formează prin iradierea ergosterolului la λ cuprinse între 255 și 313 nm.	În cazul șobolanului alb are aceeași activitate vitaminică ca și colecalciferolul (D_3); în cazul puilor de găină și primatelor activitatea vitaminică este redusă.

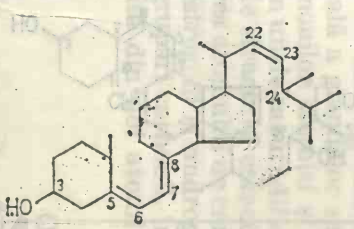
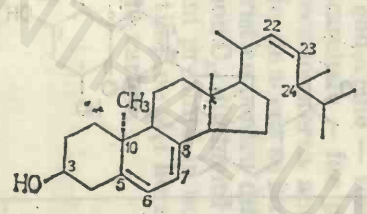
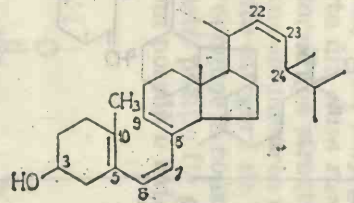
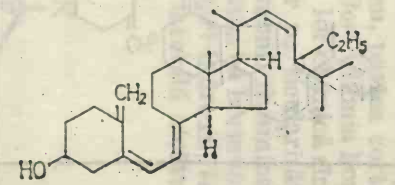
* Denumirile utilizate pentru vitaminele D sînt cele recomandate de Comisia pentru nomenclatură biochimică IUPAC – IUB (1965).

** O unitate internațională de vitamină *D* este egală cu 0,025 mg vitamină D_3 cristalizată.

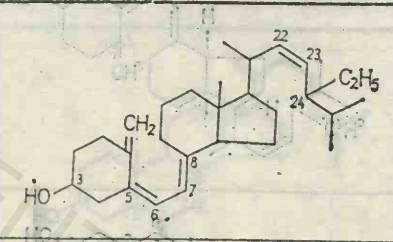
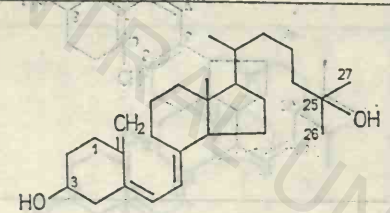
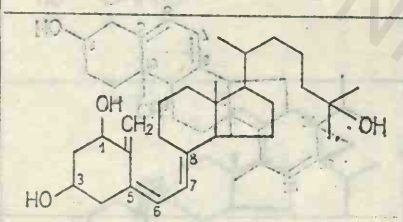
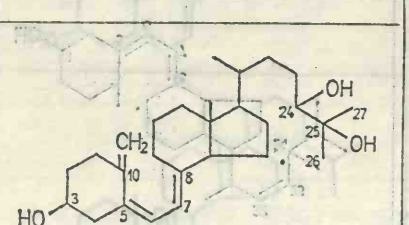
TABELUL 12.1 (continuare)

0	1	2	3
7-Dehidrocolesterol		Animale superioare și om.	Lipsit de activitatea biologică; este provitamina colecalciferolului (D_3)
Colecalciferol ** (D_3)		Se formează prin iradierea 7-dehidrocolesterolului la λ cuprinse între 255 și 313 nm. Se găsește în cantități apreciabile în uleiul de ficat de pește, în gălbenușul de ou, în lapte.	Vitamina antirahitică. Este sintetizată de organism. În perioada creșterii, în timpul sarcinii și alăptării necesitățile în vitamină D_3 cresc și este necesar un aport zilnic de 4 000 UI per os. Uleiul ficatului de ton conține între 7 000 și 50 000 UI per gram, iar al ficatului de morun 60—300 UI/g.
Vitamina D_4		Se formează prin iradierea 22-dihidroergosterolului	Posedă o activitate vitaminică inferioară colecalciferolului (D_3)
Cetona 250 (vitamina D_7)		Răspîndită în vegetale, în uleiul din ficatul de pește	Are o activitate vitaminică de 10 ori mai mică decît colecalciferolul (D_3)

BCU Cluj / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Lumisterol		Se formează prin iradierea ergosterolului	Nu are activitate vitaminică.
Tachisterol		Se găseşte în uleiuri, este uşor oxidabilă la aer	Fără acţiune vitaminică. În organism are un efect hipercalcemiant.
Dehidrotachisterolul		Substanţă de sinteză.	Are o acţiune vitaminică de 400 ori mai mică decît a colecalciferolului şi acelaşi efect hipercalcemiant ca şi tachisterolul
Vitamina D_5			

TABELUL 12.1 (continuare)

0	1	2	3
Vitamina D_6			
25-Hidroxicolecalciferolul sau 25-hidroxivitamina D_3		Hidroxilarea vitaminei D_3 are loc în reticulul endoplasmatic al celulelor hepatice în prezența oxigenului molecular	Substanță mai polară decît colecalciferolul dar mai greu solubilă în grăsimi. Stimulează într-un grad mai mare transportul calciului prin membrana intestinală. Este de 1,4 ori mai activă decît D_3.
1,25-Dihidroxicolecalciferolul sau 1,25-dehidroxivitamina D_3		Izolată din intestinul subțire și din rinichii de pui. Se formează din 25-hidroxicolecalciferol în mitocondriile celulelor renale și în prezența oxigenului molecular	Activitate vitaminică mult superioară colecalciferolului și activă atît asupra metabolismului calciului cît și asupra osului. Este de 100 de ori mai activă decît 25-hidroxi-D_3
24,25-Dihidroxicolecalciferolul sau 24,25-dihidroxivitamina D_3		Se formează în rinichi cînd calcemia este normală sau crescută.	Rol metabolic necunoscut.

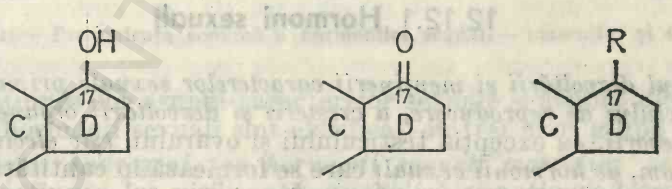
BCU IASI/CENTRALA UNIVERSITARA/SITE LIBRARY

Lumisterolul și *tachisterolul* sînt produse secundare ale reacției fotochimice și nu intermediari ai acesteia. La om, sursa exogenă de vitamină D o constituie alimentele, bila fiind necesară pentru resorbția acesteia la nivelul intestinului; sursa endogenă de provitamina D pentru om o constituie 7-dehidrocolesterolul care se găsește în concentrații relativ mari în piele, ceea ce explică acțiunea terapeutică a expunerii la soare sau la radiații UV în cazul rahitismului.

Vitaminele D sînt depozitate și metabolizate în ficat, dar folosindu-se vitamine marcate cu ^{14}C s-a demonstrat că ele sînt prezente și în rinichi, intestin, suprarenale, țesutul osos, fecale etc. La șobolanul alb o cantitate mică de vitamine D sînt esterificate cu taurina și glicocolul și excretate în bilă de unde sînt ulterior parțial reabsorbite. K o d i c e k (1970), D e L u c a (1973) și colaboratorii lor au demonstrat că efectul metabolic al vitaminelor D se datorește metaboliților lor care se formează în fracția nucleară a omogenatelor de mucoasă intestinală *(25-hidroxicolecalciferol)* și în reticulul endoplasmatic al celulelor hepatice în prezența oxigenului molecular și *1,25-dihidroxicalciferolului* care ia naștere în mitocondriile celulelor hepatice în aceleași condițiuni (vezi capitolul 18).

12.12 HORMONI STEROIZI

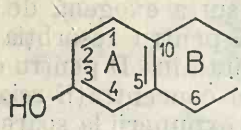
Numeroși *hormoni* sintetizați de organism din colesterol sau derivații acestuia în glandele endocrine — testicul, ovar, corp galben, partea corticală a glandelor suprarenale — fac parte din *clasa steroizilor*. Chimia hormonilor steroizi și recunoașterea acestora după structura lor chimică sînt în unele cazuri dificile, de aceea se impune enumerarea unor particularități de structură caracteristice pentru diferite categorii de hormoni. Examinarea atomului de carbon C_{17} din inelul *D* conduce la constatarea că hormonii estrogeni și androgeni prezintă în această poziție fie grupări hidroxil, fie grupări carbonil, în timp ce alți hormoni posedă o catenă laterală alcătuită din doi atomi de carbon:



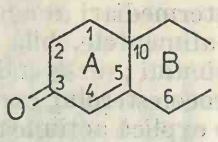
Hormoni estrogeni și androgeni *Alți hormoni*

Hormonii estrogeni se deosebesc de hormonii androgeni prin faptul că inelul lor *A* este de natură fenolică, prezentînd în poziția C_3 o grupare hidroxil și fiind lipsiți de gruparea metil angulară de la atomul de C_{10}. Inelul *A* în hormonii androgeni prezintă o dublă legătură între atomii de carbon C_4 și C_5, în poziția C_3 au o grupare carbonil, iar la gruparea metil angulară

este prezentă :



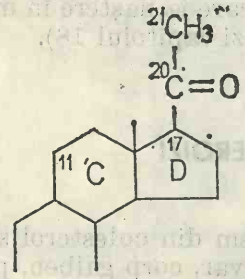
Hormoni estrogeni



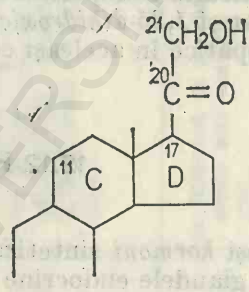
Hormoni androgeni

Dintre toți hormonii steroizi numai hormonii estrogeni au inelul *A* de natură aromatică, ceea ce constituie particularitatea lor unică. Ceilalți hormoni steroizi prezintă, de cele mai multe ori în inelul *A* o dublă legătură situată, de regulă, între C_4 și C_5.

Hormonii steroizi care prezintă la C_{17} o catenă laterală alcătuită din doi atomi de carbon pot fi împărțiți la rîndul lor în două mari clase : *progesteron și corticoizi* :



Progesteron



Corticoizi

Catena laterală în cazul progesteronului se termină printr-o grupare metil, iar la corticoizi printr-o grupare alcoolică primară. Corticoizii prezintă, de asemenea, în inelul C, la atomul de carbon C_{11} o grupare hidroxil sau o grupare ceto.

12.12.1 Hormoni sexuali

Controlul dezvoltării și menținerii caracterelor sexuale primare și secundare, al ciclului de reproducere, a creșterii și dezvoltării organelor reproducătoare accesorii, cu excepția testiculului și ovarului, *este efectuat, la vertebrate și la om, de hormonii sexuali* care se formează în cantități apreciabile după maturarea sexuală a organismului.

Toți *hormonii sexuali sînt de natură steroidică.* Ei sînt *sintetizați de organismul animal la nivelul glandelor cu secreție internă — testicul, ovar, glande suprarenale, placentă — și sînt excretați în limfă sau uneori în sînge,* care îi transportă la organele efectoare. T. B e r z i n definește hormonii sexuali drept *„substanțe de creștere care posedă acțiuni specifice pe care le exercită asupra unor organe specifice și care influențează comportarea sexuală și caracterele sexuale primare și secundare"*.

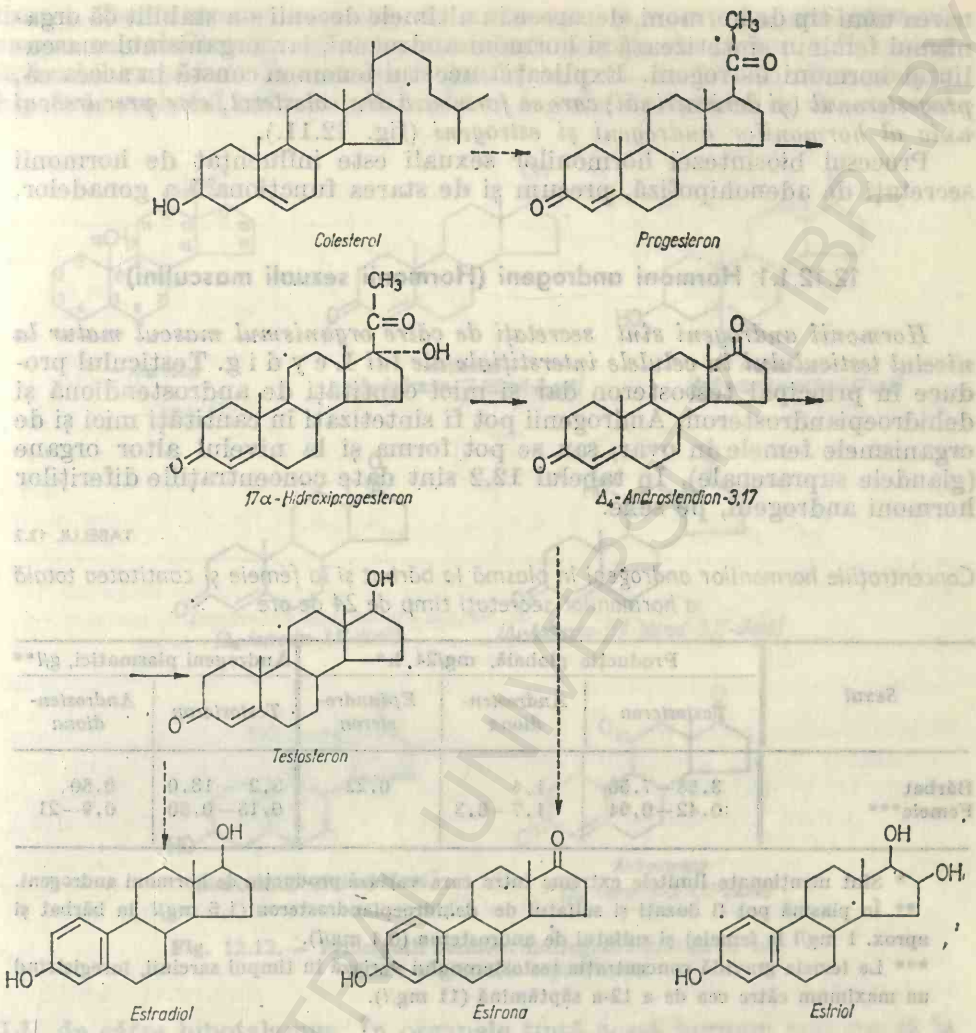


Fig. 12.11. — Proveniența comună a hormonilor sexuali — masculini și feminini.

După acțiunea lor asupra caracterelor sexuale și asupra metabolismului animal, hormonii sexuali sînt clasificați în trei mari grupe :

— *hormonii androgeni sau hormonii sexuali masculini* se caracterizează prin acțiunea lor virilizantă, anabolică și antigonadotropă ;

— *hormonii estrogeni sau hormonii sexuali feminini* au o acțiune de feminizare și participă la reglarea procesului ciclului menstrual ;

— *hormonii gestageni* se caracterizează prin *acțiunea lor asupra uterului și prin capacitatea de a facilita menținerea sarcinii.*

Această clasificare a hormonilor, în hormoni sexuali masculini și hormoni sexuali feminini este într-o oarecare măsură arbitrară, didactică, avînd la bază două criterii — rezultatul acțiunii fiziologice și predomi-

narea unui tip de hormoni, deoarece în ultimele decenii s-a stabilit că organismul feminin sintetizează şi hormoni androgeni, iar organismul masculin şi hormoni estrogeni. Explicaţia acestui fenomen constă în aceea că, *progesteronul (şi derivaţii săi) care se formează din colesterol, este precursorul unic al hormonilor androgeni şi estrogeni* (fig. 12.11.).

Procesul biosintezei hormonilor sexuali este influenţat de hormonii secretaţi de adenohipofiză, precum şi de starea funcţională a gonadelor.

12.12.1.1 Hormoni androgeni (Hormonii sexuali masculini)

Hormonii androgeni sînt secretaţi de către organismul mascul matur la nivelul testicululuí în celulele interstiţiale ale lui L e y d i g. Testiculul produce în principal testosteron dar şi mici cantităţi de androstendionă şi dehidroepiandrosteron. Androgenii pot fi sintetizaţi în cantităţi mici şi de organismele femele în ovar, sau se pot forma şi la nivelul altor organe (glandele suprarenale). În tabelul 12.2 sînt date concentraţiile diferiţilor hormoni androgeni, pe sexe.

TABELUL 12.2

Concentraţiile hormonilor androgeni în plasmă la bărbat şi la femeie şi cantitatea totală a hormonilor secretaţi timp de 24 de ore

Sexul	Producţie globală, mg/24 h*			Androgeni plasmatici, g/l**	
	Testosteron	*Androsten-diona*	*Epiandro-steron*	*Testosteron*	*Androsten-diona*
Bărbat	3,58—7,56	1,4	0,22	3,2 —13,0	0,60
Femeie***	0,42—0,94	1,7—6,3		0,13—0,80	0,9—21

* Sînt menţionate limitele extreme între care variază producţia de hormoni androgeni.

** În plasmă pot fi dozaţi şi sulfatul de dehidroepiandrosteron (1,5 mg/*l* la bărbat şi aprox. 1 mg/l la femeie) şi sulfatul de androsteron (0,4 mg/*l*).

*** La femeia gravidă concentraţia testosteronului variază în timpul sarcinii, înregistrînd un maximum către cea de a 12-a săptămînă (11 mg/*l*).

Activitatea endocrină a testicululuí a fost descoperită de B e r t h o l d în anul 1849, care extirpînd testiculele de la cocoş a observat că animalele îşi pierd caracterele sexuale specifice. Cercetările ulterioare efectuate de F. K o c h, B u t e n a n d t, L a q u e u r, R u z i č k a şi a l ţ i i au precizat diferitele etape ale sintezei, metabolismului, excreţiei hormonilor androgeni şi ale mecanismului lor de acţiune.

Hormonii androgeni au la bază nucleul androstanic (fig. 12.12).

Testosteronul, principalul hormon masculin, secretat în cantitatea cea mai mare la nivelul celulelor interstiţiale ale lui L e y d i g, este cel mai activ şi deci adevăratul hormon androgen.

Acest hormon stimulează creşterea normală a organelor sexuale masculine (creşterea şi funcţionarea epididimului, a vaselor deferente, a prostatei, veziculelor seminale şi a penisului), influenţînd spermatogeneza şi dezvoltarea caracterelor secundare sexuale la bărbaţi (voce, pilozităţi, viri-

lizare). Testosteronul exercită, de asemenea, și o acțiune anabolizantă asupra metabolismului proteic, stimulînd retenția de azot și influențînd favorabil creșterea. Testosteronul inhibă secreția de LH de către glanda hipofiză, probabil indirect prin reglarea formării factorului de eliberare al

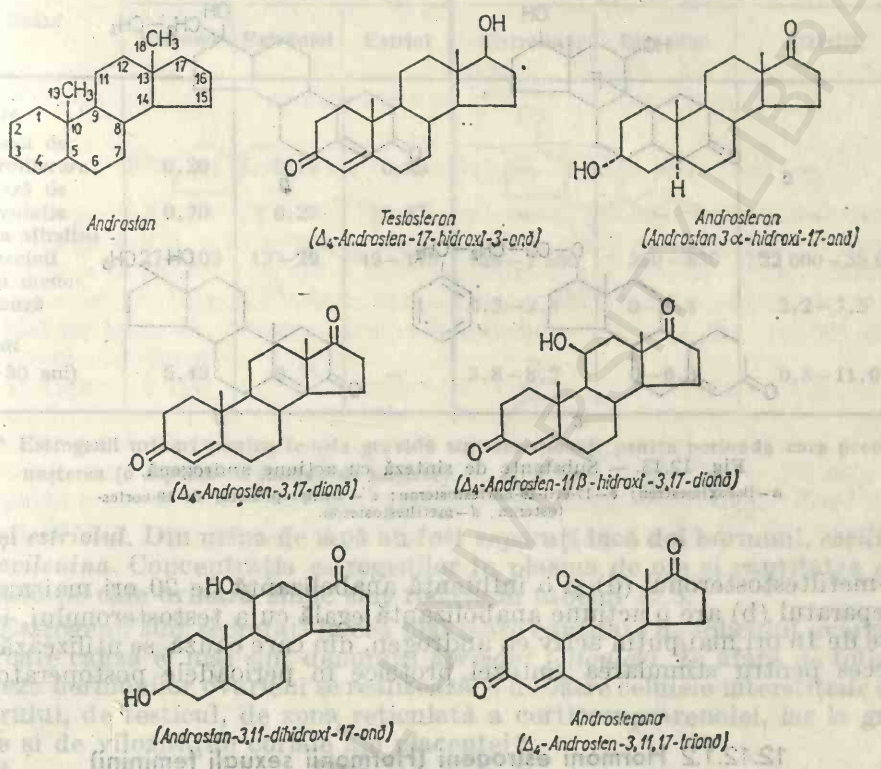


Fig. 12.12. — Principalii hormoni androgeni secretați de testicule și glandele suprarenale.

LH de către hipotalamus. În organele țintă acest hormon acționează la nivelul nucleului celular influențînd sinteza de RNA.

Lipsa hormonilor androgeni sau hiposecreția lor sînt însoțite de oprirea creșterii organismului, regresul organelor sexuale masculine și de tulburări metabolice.

Hipersecreția androgenilor sau administrarea lor produce retenția apei, Na^+, K^+, Ca^{++}, P și N în organism.

Agenții oxidanți distrug gruparea —OH din poziția 17 a testosteronului, inactivîndu-l.

Esterii testosteronului folosiți în scopuri terapeutice au fie acțiuni rapide, de scurtă durată (propionatul de testosteron), fie o acțiune lentă (ciclopentilpropionatul de testosteron și acetatul de testosteron).

Fenilpropionatul de testosteron și-a găsit o largă utilizare datorită proprietăților lui de a stimula puternic anabolismul fără a avea o acțiune virilizantă.

Unele preparate obținute pe cale sintetică, de exemplu floroximestronul (fig. 12.13 a), 17-etil-19-nortestosteronul (b) și 19-nortestosteron-fenilpropionatul (c) au o acțiune androgenică de 10 ori mai mare (a) decît

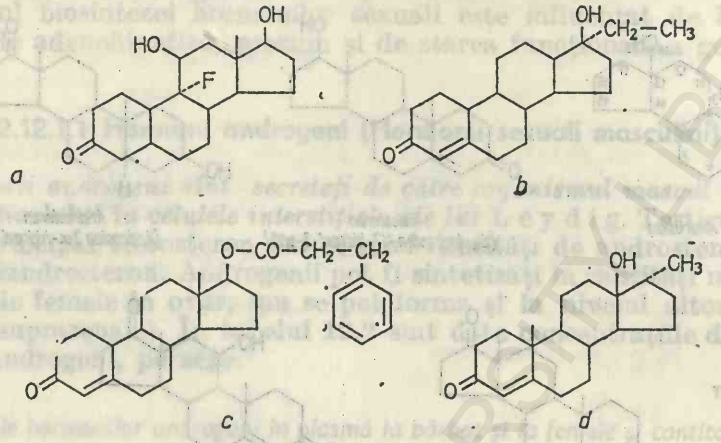


Fig. 12.13. — Substanțe de sinteză cu acțiune androgenă.
a—floroximestron; *b*—17-etil-19-nortestosteron; *c* — fenilpropionatul de 19-nortestosteron; *d*—metiltestosteron.

17-metiltestosteronul (d) și o influență anabolizantă de 20 ori mai mare. Preparatul (b) are o acțiune anabolizantă egală cu a testosteronului, însă este de 16 ori mai puțin activ ca androgen, din care cauză se utilizează cu succes pentru stimularea sintezei proteice în perioadele postoperatorii.

12.12.1.2 Hormoni estrogeni (Hormonii sexuali feminini)

Primele cunoștințe despre secreția și funcțiile fiziologice ale ovarului în dezvoltarea și manifestarea caracterelor sexuale primare și secundare datează din jurul anului 1895, cînd pe animale castrate s-a efectuat prima transplantare experimentală a ovarului. Restabilirea provizorie a structurii și funcțiilor organelor sexuale după transplantarea ovarului a dus la concluzia că acest organ secretă, probabil, substanțe active cu efect asupra organelor sexuale.

Răspîndirea universală a estrogenilor în regnul animal și vegetal subliniază rolul important al acestor hormoni pentru organismele vii. În prezent se cunoaște că *funcția de înmulțire la mamiferele femele, care au ajuns în faza de maturare sexuală, este strîns legată de metabolismul a două grupe de hormoni: estrogeni, produși de către foliculii* De Graaf, *și hormonii gestageni*, care provin din corpul galben. Acești hormoni sexuali feminini au o mare influență asupra psihicului și morfologiei unei femei.

Estrogenii conțin 18 atomi de C și pot fi considerați ca derivînd de la *estratrien* (fig. 12.14.). Se cunosc trei hormoni estrogeni: *estrona, estradio-*

TABELUL 12.3

Concentrația estrogenilor în plasma de om și cantitatea zilnică de estrogeni eliminați pe cale urinară

Sexul	*Estrogeni plasmatici, μ/l*			*Estrogeni urinari, μ/24 h**		
	Estronă	Estradiol	Estriol	Estronă	Estradiol	Estriol
Femeie						
— Fază de proliferare	0,20	0,15	0,25	—	—	—
— Fază de ovulație	0,70	0,28	0,37	—	—	—
— La sfîrșitul sarcinii	27—103	13—29	49—175	930—1 600	380—630	22 000—35 000
— În menopauză				0,3—2,4	0—1,4	2,2—7,5
Bărbat (20—50 ani)	0,42	0,15	—	3,8—8,2	0—6,3	0,8—11,0

* Estrogenii urinari pentru femeia gravidă sînt menționați pentru perioada care precede nașterea (o săptămînă înainte de naștere).

lul și *estriolul*. Din urina de iapă au fost separați încă doi hormoni, *ecvilina* și *ecvilenina*. Concentrația estrogenilor în plasma de om și cantitatea excretată pe cale urinară zilnic sînt redate în tabelul 12.3.

Estrogenii sînt secretați în cea mai mare cantitate de foliculul ovarian, din care cauză ei mai sînt denumiți *hormoni foliculari*. În afară de folicul sinteza hormonilor ovarieni se realizează și de către celulele interstițiale ale ovarului, de testicul, de zona reticulată a corticosuprarenalei, iar la gravide și de vilozitățile coriale ale placentei*.

În prezent se presupune că toți hormonii estrogeni, cu excepția ecvilinei și ecvileninei, derivă de la estronă. În figura 12.15. sînt ilustrate principalele relații metabolice dintre diferiții hormoni estrogeni. Trecerea estronei în 17-α-estradiol este o reacție pusă în evidență în cazul șoarecilor, care are însă pentru om o importanță redusă. Estriolul, principalul hormon estrogen identificat în urină și în placenta femeilor gravide se formează în urma unei hidroxilări a estronei în poziția C_{16} și a unei reduceri a funcției cetonice din poziția C_{17}.

Hormonii estrogeni acționează asupra aparatului genital, determinînd dezvoltarea tractului genital și proliferarea mucoasei uterine influențînd direct funcția de perpetuare a speciei. Apariția și menținerea caracterelor sexuale secundare se găsesc sub influența hormonilor estrogeni.

Estrogenii influențează metabolismul glucidelor, purinelor și proteinelor, activează deoxiribonucleaza și stimulează osteogeneza. La nivel celular hormonii estrogeni sînt legați de organite și compuși specifici organelor țintă, adică în principal, uterul, participînd la sinteza RNA nuclear

* Unii estrogeni se întîlnesc și în regnul vegetal.

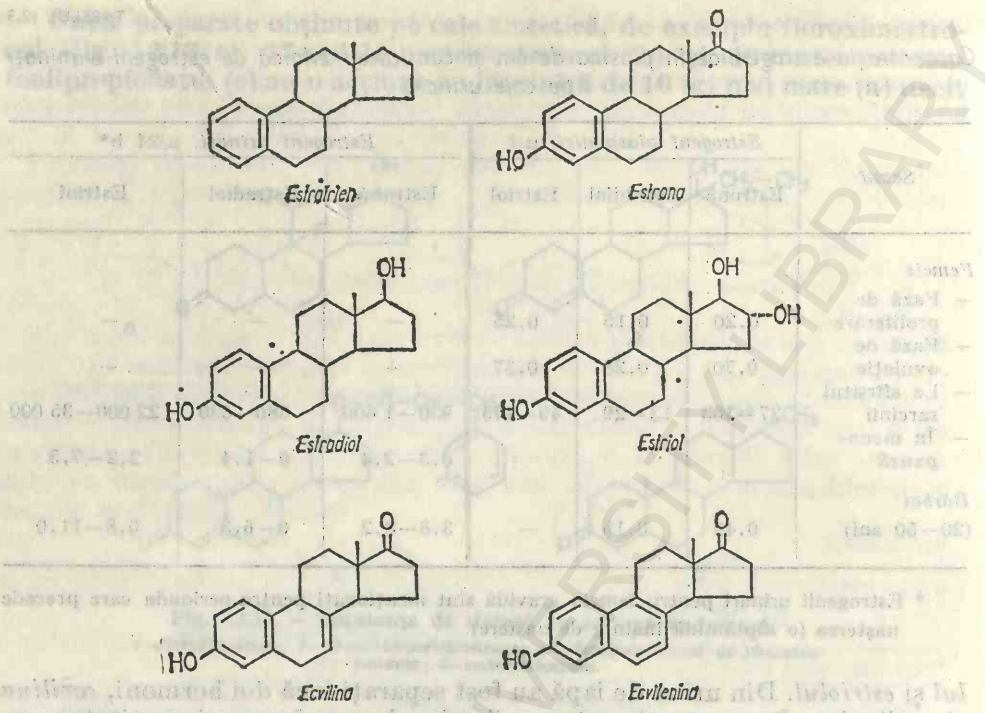


Fig. 12.14. — Hormonii estrogeni.

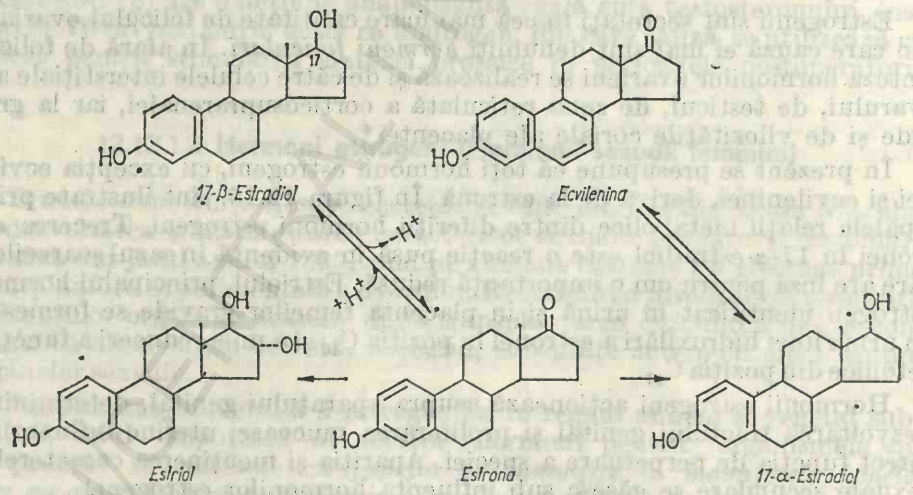


Fig. 12.15. — Relaţiile metabolice dintre diferiţi hormoni estrogeni.

şi la procesul de proteinogeneză. La nivelul glandelor cu secreţie internă estrogenii inhibă secreţia de factor de eliberare LH/FSH de către hipotalamus şi deci şi secreţia de LH şi FSH la nivelul hipofizei (mecanismul lor de acţiune este descris în capitolul 13). În doze mari aceşti hormoni provoacă o osificare precoce a cartilagiilor, ceea ce are drept urmare o înceti-

nire a creşterii. Estrogenii influenţează metabolismul hidromineral, determinînd reţinerea NaCl şi a apei în organism prin creşterea resorbţiei la nivelul tubilor renali.

La animale hormonii estrogeni declanşează fenomenul cunoscut sub denumirea de *oestrus*, care se concretizează printr-o serie de modificări la nivelul aparatului reproducător femel, însoţite de ovulaţie.

La femei hormonii estrogeni pregătesc mucoasa uterină în vederea acţiunii ulterioare a hormonilor gestageni. Aceşti hormoni frînează secreţia de hormon foliculostimulator (FSH) de către hipofiză.

12.12.1.3 Substanţe de sinteză cu acţiune estrogenă

Estrogenii de sinteză sînt utilizaţi, îndeosebi, pentru tratamentul cancerului de prostată, a artrozelor şi tulburărilor circulatorii sanguine, pentru stimularea lactaţiei, precum şi contra fenomenelor care survin în perioada de menopauză. Ei pot fi administraţi fie per os, fie parenteral, deoarece la nivelul ficatului inactivarea lor de către enzime este mult mai redusă decît în cazul estrogenilor naturali.

În figura 12.16 sînt redate formulele unor estrogeni de sinteză care păstrează în structura lor nucleul estranului. Alte preparate sintetice cu acţiune estrogenă derivă de la unii compuşi ai fenantrenului, naftalinei şi stilbenului, care nu au o structură steroidică. 17-α-Etinilestradiolul este un preparat activ aplicat cu succes în cazul unei dereglări a lactaţiei după naşterea fătului; estradiol-17-β-ciclopentilpropionatul este un preparat cu

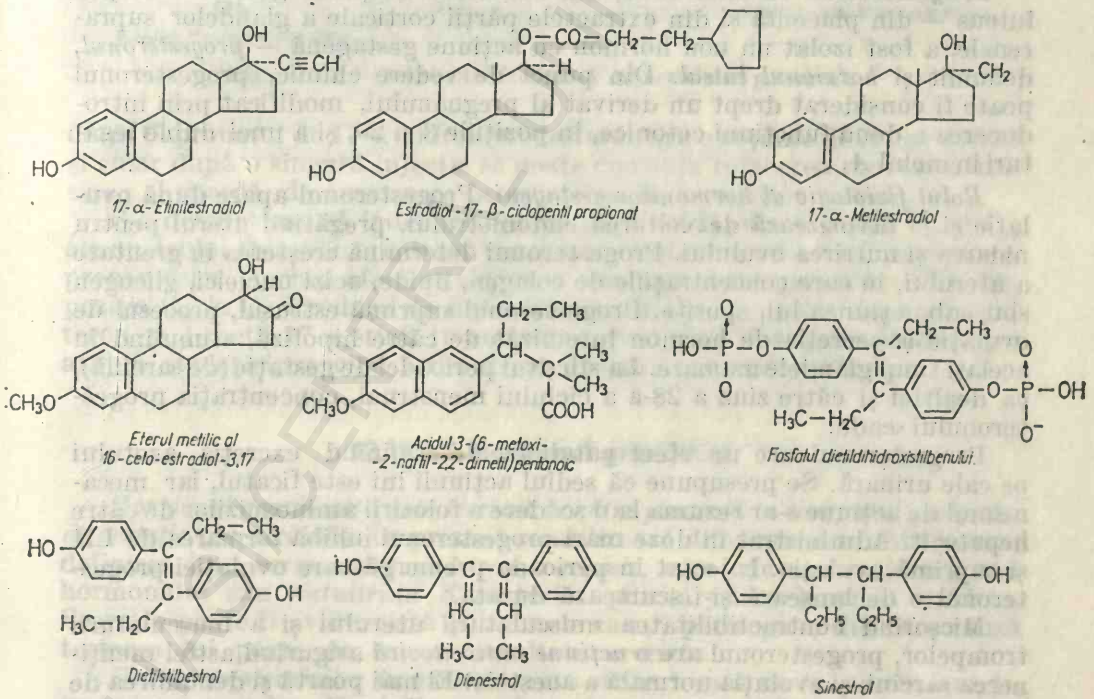


Fig. 12.16. — Substanţe de sinteză cu activitate estrogenă.

32 — c. 636

acțiune îndelungată, care se administrează subcutan, în timp ce difosfatul de dietilstilbestrol se injectează intravenos și devine activ numai după scindarea de către fosfataza „acidă" a resturilor fosforice. Acest preparat este utilizat pentru tratamentul cancerului de prostată, datorită proprietăților sale citostatice. Estrogenul sintetic amintit blochează în celulele canceroase din prostată sinteza enzimatică a acidului ribonucleic și implicit sinteza *de novo* a proteinelor. Dienestrolul este folosit pentru provocarea lactației la animalele domestice și se administrează intramuscular sub forma unei suspensii cristaline. Acidul dimetilpentanoic, derivat al naftalinei, se folosește în combaterea fenomenului de menopauză. Dietilstilbestrolul și sinestrolul se utilizează per os, subcutan și intramuscular contra artrozelor și tulburărilor circulatorii.

12.12.1.4 Alți estrogeni

Estrogenii, sau substanțele cu acțiune estrogenică, au fost izolați și din unele plante. Astfel, de exemplu, din *Soja hispida* și *Genista tinctoria* s-a izolat un compus *genisteina*, care posedă oarecare proprietăți estrogenice, și are acțiune anticoncepțională. Estrona a fost identificată în floemul de palmieri, iar estriolul în amenții de salcie.

12.12.1.5 Hormoni gestageni

Progesteronul. În anul 1934, din extractele corpului galben — corpus luteus — din placentă și din extractele părții corticale a glandelor suprarenale, a fost izolat un nou hormon cu acțiune gestagenă — *progesteronul*, denumit și *hormonul luteal*. Din punct de vedere chimic, progesteronul poate fi considerat drept un derivat al pregnanului, modificat prin introducerea a două funcțiuni cetonice, în pozițiile 3 și 20, și a unei duble legături în inelul *A*.

Rolul fiziologic al hormonilor gestageni. Progesteronul apare după ovulație și el favorizează dezvoltarea endometrului, pregătind uterul pentru nidarea și nutrirea ovulului. Progesteronul determină creșterea în greutate a uterului, în care concentrațiile de colagen, lipide, acizi nucleici, glicogen sînt sub acțiunea lui, sporite. Progesteronul suprimă estrusul, procesul de ovulație și secreția de hormon luteinizat de către hipofiză, stimulînd în același timp glandele mamare. La sfîrșitul perioadei de gestație (de sarcină), ca dealtfel și către ziua a 28-a a ciclului menstrual, concentrația progesteronului scade.

Progesteronul are un efect catabolic determinînd excreția azotului pe cale urinară. Se presupune că sediul acțiunii lui este ficatul, iar mecanismul de acțiune s-ar rezuma la o scădere a folosirii aminoacizilor de către hepatocit. Administrat în doze mari progesteronul inhibă formarea de LH și suprimă ovulația. Injectat în perioada premergătoare ovulației progesteronul o declanșează și-i scurtează durata.

Micșorînd contractibilitatea musculaturii uterului și a musculaturii trompelor, progesteronul are o *acțiune antiocitocică* asigurînd astfel menținerea sarcinii și evoluția normală a acesteia. El mai poartă și denumirea de *hormonul maternității*.

12.12.1.6 Substanțe de sinteză cu acțiune gestagenă

Pe cale sintetică au fost obținute mai multe preparate care au acțiune gestagenă, fie după injectarea lor intramusculară, fie după administrarea lor per os (fig. 12.17.). Acetatul de 6-α-metil-17-α-acetoxiprogesteron acționează cînd este administrat per os și nu are acțiune androgenică secun-

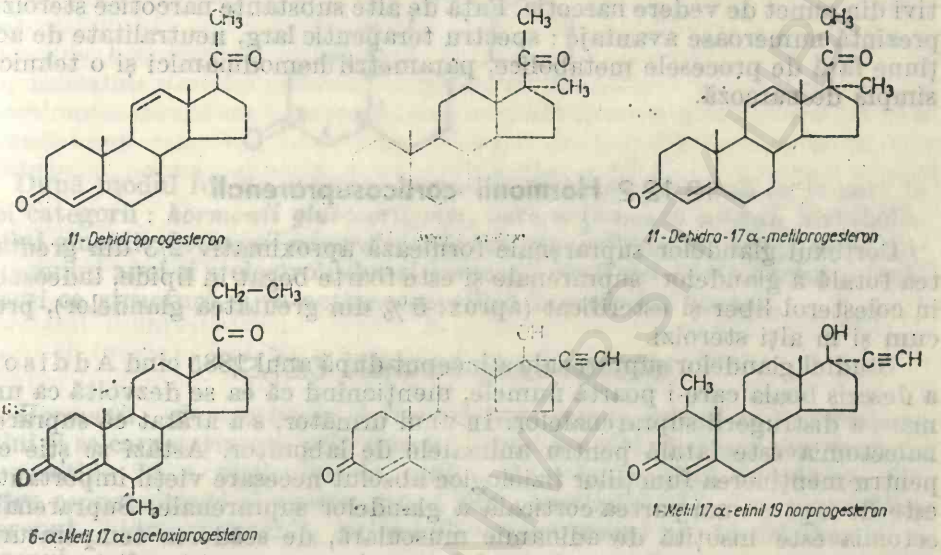


Fig. 12.17. — Substanțe de sinteză cu activitate gestagenă.

dară. Capronatul de 17-α-hidroxiprogesteron are o acțiune de lungă durată și chiar după o singură injecție se poate constata refacerea mucoasei uterine; el posedă, de asemenea, proprietatea de a menține sarcina.

S-a demonstrat că îndepărtarea grupării $-CH_3$ din pozițiile C_{18} și C_{19} ale nucleului steroidic are drept rezultat o creștere a activității biologice a preparatelor. Același efect se obține și prin transferul grupării $-CH_3$ din poziția C_{19} la C_1. Produșii de sinteză, de exemplu 17-α-etinil-19-nortestosteron și 1-metil-17-α-etinil-19-nortestosteron — au o acțiune inhibitoare asupra ovulației, servind astfel drept droguri anticoncepționale.

12.12.1.7 Hormonul graviditații

Hormonul graviditații este secretat de către placentă la începutul perioadei de gestație (de sarcină). În prezent se utilizează diferitele denumiri pentru definirea lui: *hormonul gonadotrop, corionic*, care desemnează originea hormonului sau *antuitrina S* (anterior pituitary-like hormon — APL). Secreția poate fi evidențiată și în unele cazuri patologice, din care cauză testarea lui poate da uneori rezultate eronate.

Utilizarea steroizilor în anestezie este strîns legată de succesele înregistrate în sinteza lor. Unul dintre cele mai răspîndite preparate, utilizat pe scară largă în clinică, este hidroxidiona, compus cu o structură asemănă-

toare cu a deoxicorticosteronului. Acest preparat este hidrolizat în organism cu formarea unui compus intermediar — pregnan-21-ol-3,20-diona — care posedă proprietăţi narcotice evidente. Ulterior, acest compus este redus la pregnan-21,3-α-diol-20-ona cu proprietăţi narcotice mai puternic exprimate. Ambele substanţe apar, în primele 15—20 minute după injectare, în cantităţi relativ mari (90—130μg%) în sînge şi sînt eliminate din organism pe cale urinară sub formă de glucuronoconjugaţi, compuşi inactivi din punct de vedere narcotic. Faţă de alte substanţe narcotice steroizii prezintă numeroase avantaje : spectru terapeutic larg, neutralitate de acţiune faţă de procesele metabolice, parametrii hemodinamici şi o tehnică simplă de narcoză.

12.12.2 Hormonii corticosuprarenali

Cortexul glandelor suprarenale formează aproximativ 2/3 din greutatea totală a glandelor suprarenale şi este foarte bogat în lipide, îndeosebi în colesterol liber şi esterificat (aprox. 5% din greutatea glandelor), precum şi în alţi steroizi.

Studiul glandelor suprarenale a început după anul 1885 cînd Addison a descris boala care-i poartă numele, menţionînd că ea se dezvoltă ca urmare a distrugerii suprarenalelor. În anul următor, s-a arătat că suprarenalectomia este fatală pentru animalele de laborator. Astăzi se ştie că pentru menţinerea funcţiilor fiziologice absolut necesare vieţii importantă este de fapt numai partea corticală a glandelor suprarenale. Suprarenalectomia este însoţită de adinamie musculară, de scăderea temperaturii corpului, de vome şi diaree. Animalele mor în urma unei insuficienţe cardiace. Studiul detaliat a pus în evidenţă importante modificări în metabolismul glucidic şi în compoziţia minerală a unor ţesuturi. Hormonii corticoizi modifică excitabilitatea sistemului nervos central şi în consecinţă acţionează şi asupra psihicului.

Hormonii corticoizi influenţează şi sistemul limfatic. Administrarea lor determină o involuţie a ţesutului limfoid, care într-o primă fază se manifestă prin liza timocitelor şi a limfocitelor din ganglionii limfatici, urmată de o inhibiţie a citopoiezei şi de degenerescenţa ţesutului conjunctiv reticular. Ei acţionează, de asemenea, asupra anticorpilor circulanţi şi în funcţie de doză şi de specie măresc sau micşorează concentraţia acestora.

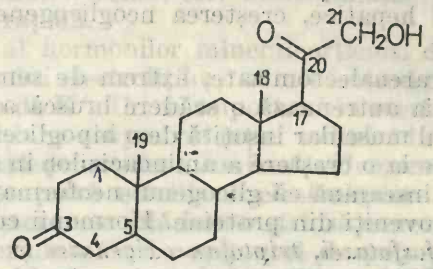
Datorită acţiunii lor protectoare asupra membranelor lizozomale administrarea de glucocorticoizi inhibă procesele inflamatorii de origine traumatică, alergică, infecţioasă sau toxică.

Datorită originii embriologice comune, glandele suprarenale şi gonadele se dezvoltă din ţesutul mesodermic al nefronului, unii hormoni corticosuprarenali amintesc ca structură şi acţiune fiziologică de unii hormoni sexuali.

Din extractul glandelor suprarenale au fost cristalizaţi peste 28 compuşi, însă numai cinci dintre aceştia au putut fi identificaţi şi la om şi posedă o activitate fiziologică.

Toţi hormonii corticoizi care asigură funcţiile principale ale glandei suprarenale au la bază structura cu 21 atomi de carbon · Δ_4-pregnen-21-ol, 3,20-diona, şi activitatea lor este legată de prezenţa în inelul *A* a unei con-

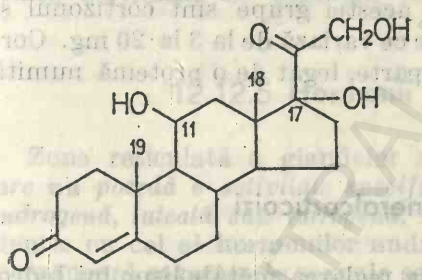
formații Δ_4-3-ceto și a grupării ceto la atomul C_{20}. Numai aldosteronul se particularizează printr-o grupare aldehidică la C_{18}, restul corticoizilor prezentînd grupări metilice angulare la C_{18} și C_{19}.



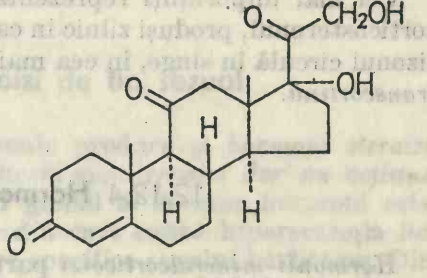
După modul lor de acțiune, hormonii corticosuprarenali se împart în trei categorii: *hormonii glucocorticoizi*, care acționează asupra metabolismului glucidic, *hormonii mineralocorticoizi*, care influențează reglarea metabolismului apei și a electroliților și *hormonii corticoizi de tip sexual* asemănători ca structură și ca acțiune specifică hormonilor sexuali.

12.12.3 Hormoni glucocorticoizi

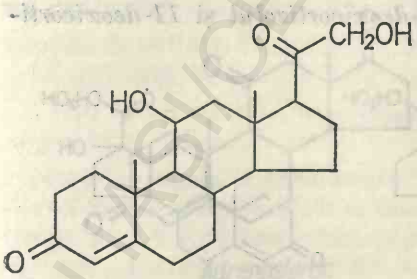
Hormonii glucocorticoizi formează așa-numita grupă a corticosteronului și se caracterizează prin prezența unei grupări alcoolice sau cetonice în pozițiile 11 a nucleului de bază — Δ_4-pregnen-21-ol-3,20-diona. Cei patru reprezentanți ai acestei grupe sînt: *cortizolul* (17-α-hidroxicorticosteronul, hidrocortizonul), *cortizonul*, *corticosteronul* și 11-*dehidrocorticosteronul*:



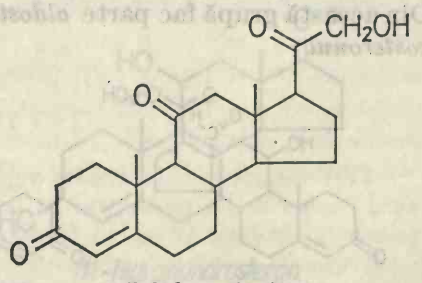
Cortizol



Cortizon



Corticosteron



11-Dehidrocorticosteron

Hormonii steroizi din această grupă care sînt oxigenați în pozițiile 11 și 17 ale nucleului de bază exercită un efect puternic asupra metabolismului glucidelor, concretizat prin creșterea nivelului glucozei sanguine, o scădere a lipogenezei hepatice, creșterea neoglicogenezei și accentuarea catabolismului proteic.

La animalele suprarenalectomizate, extrem de sensibile față de acțiunea insulinei, inanița antrenează o scădere bruscă a rezervelor de glucide din ficat și țesutul muscular însoțită de o hipoglicemie. Administrarea de corticosteroizi duce la o creștere a aminoacizilor în sînge și la eliminarea azotului, ceea ce înseamnă că glicogenul neoformat este sintetizat pe baza metaboliților proveniți din proteine. Hormonii corticoizi stimulează activitatea *glucozo-6-fosfatazei*, *triptofan oxigenazei* și *tirozin aminotransferazei*, formarea de RNA mesager și de noi enzime, acționînd, probabil, asupra genelor.

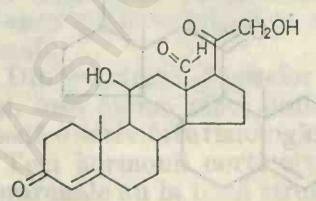
Aceste efecte sînt însoțite de o reducere a matricei osoase (cortizolul este un antagonist al vitaminei *D* și inhibă absorbția intestinală a calciului alimentar), de osteoporoză.

Hormonii glucocorticoizi acționează asupra metabolismului lipidelor influențînd oxidarea, mobilizarea și depunerea lipidelor, procesul de *lipogeneză*. Insuficiența corticosuprarenală este însoțită de o mobilizare redusă a lipidelor din țesuturile periferice, de o pierdere pe cale renală a Na, *hiponatremie*, *hipercalemie*, de reducerea în volum a *fluidelor extracelulare*, și de hiperhidratarea celulelor. Cortizolul favorizează reabsorbția sodiului în tubulii distali, stimulează procesul de excreție a potasiului și se pare că este necesar pentru menținerea funcțiilor tubulare și a diurezei în limite normale.

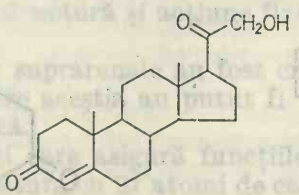
Cei mai importanți reprezentanți ai acestei grupe sînt cortizonul și corticosteronul, produși zilnic în cantitate ce variază de la 3 la 20 mg. Cortizonul circulă în sînge, în cea mai mare parte, legat de o proteină numită *transcortina*.

12.12.4 Hormonii mineralcorticoizi

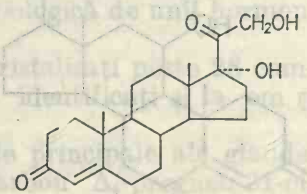
Hormonii mineralcorticoizi participă la reglarea metabolismului hidromineral și din punct de vedere chimic se deosebesc de hormonii glucocorticoizi, de regulă, prin absența grupărilor hidroxil sau cetonice în poziția 11. Din această grupă fac parte *aldosteronul*, *11-deoxicortizolul* și *11-deoxicorticosteronul*:



Aldosteron



11-Deoxicorticosteron



11-Deoxicortizol

Insuficiența corticosuprarenalei în sinteza hormonilor mineralcorticoizi se manifestă printr-un dezechilibru mineral, datorită dereglării metabolismului apei, potasiului, clorului și sodiului. Absorbția acestor componente la nivelul tubilor renali este mult diminuată și are drept consecință o deshidratare rapidă.

Rolul fiziologic al hormonilor mineralcorticoizi constă în menținerea constantă a echilibrului electroliților, ei influențînd retenția de Na^+ și Cl^- și reglînd eliminarea de K^+. Un rol important în acest proces îl deține aldosteronul, a cărui acțiune asupra retenției sodiului în organism este de 25 ori mai puternică față de acțiunea similară a deoxicorticosteronului, care, de asemenea, influențează echilibrul electroliților.

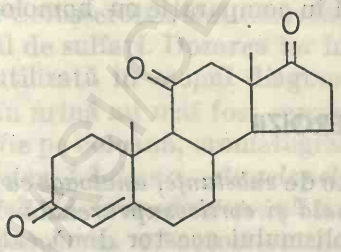
Secreția de aldosteron se află într-o strînsă conexiune cu concentrația potasiului și magneziului. Cînd conținutul de potasiu din alimente este ridicat, secreția de aldosteron este mică. Eliminarea excesului de potasiu pe cale renală se realizează grație influenței exercitate de către aldosteron asupra excreției renale. Se pare totuși că influența potasiului asupra secreției de aldosteron este independentă de volumul de lichide din organism.

Hipersecreția de aldosteron este provocată de diferite boli cum sînt, de exemplu, insuficiența cardiacă, nevroza, ciroza, nefritele etc. În hipersecreția de aldosteron se acumulează în organism cantități însemnate de sodiu și apă și apar oedemele.

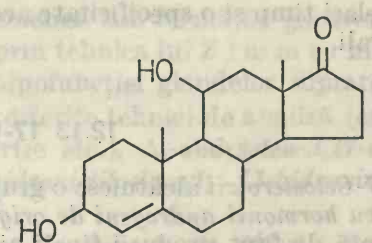
Între structura hormonilor corticoizi și activitatea lor fiziologică există o strînsă interdependență : prezența dublei legături în poziția 4 este absolut necesară, reducerea ei determinînd inactivarea hormonilor ; activitatea cortinică a hormonilor este condiționată de hidroxilul din poziția C_{21} (alți compuși cu structură analoagă, însă fără gruparea hidroxil C_{21}, nu au activitate cortinică, de exemplu progesteronul).

12.12.5 Hormonii corticoizi de tip sexual

Zona reticulată a glandelor suprarenale produce și *hormoni steroizi care nu posedă o activitate specifică corticoid-suprarenalei dar au acțiune androgenă, luteală sau estrogenă.* Efectul global al acestor hormoni este identic cu cel al hormonilor androgeni, din care cauză hipersecreția lor accentuează caracterele sexuale secundare specifice sexului bărbătesc. Din această grupă de hormoni fac parte *adrenosteronul* și *11-hidroxiandrosteronul* :



Adrenosteron



11-Hidroxiandrosteron

Preparatele de adrenosteron izolate din glandele suprarenale de bou posedă o activitate androgenică echivalentă cu aproximativ 1/5 din activitatea hormonului sexual masculin — androsteronul.

Hormonii corticoizi de tip sexual au acțiune anabolică asupra proteinelor, provocînd o reținere în organism a azotului, precum și a fosforului, potasiului, sodiului și clorurilor.

12.12.6 Analogi sintetici ai corticosteroizilor naturali

Printre hormonii corticoizi de sinteză se numără 9-α-florocortizonul, 9-α-floro-16-α-metilprednizolonul, prednizolonul și prednizonul (fig. 12.18).

Majoritatea corticoizilor de sinteză posedă o activitate mult mai pronunțată decît hormonii naturali.

După cum se vede din figura 12.18 *corticoizii de sinteză sînt derivați florurați ai cortizonului, hidrocortizonului sau ai corticosteronului.* Introduce-

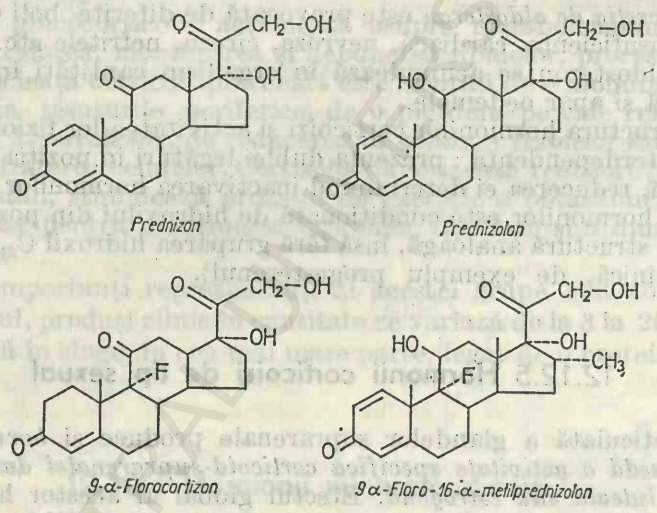


Fig. 12.18. — Structura chimică a corticoizilor sintetici

rea grupărilor metil și a florului, precum și apariția dublelor legături sînt de natură să exalte activitatea hormonală a acestor derivați, condiționînd în același timp și o specificitate accentuată în comparație cu homologii lor naturali.

12.13 17-CETOSTEROIZII

17-Cetosteroizii alcătuiesc o grupă aparte de *substanțe, analoage ca structură cu hormonii androgeni de origine sexuală și corticosuprarenală.* Ei reprezintă de fapt produșii finali ai metabolismului acestor două categorii de hormoni. Unii 17-cetosteroizi posedă o activitate hormonală (androgenă), în timp ce alții sînt total inactivi.

Din punct de vedere chimic 17-cetosteroizii sînt compuşi cu 19 atomi de carbon, care au la C_{17} al nucleului ciclopentanperhidrofenantrenic o grupare carbonil (cetonă), iar în poziţia C_3 o grupare hidroxil. Esterii sulfo- şi glucuronoconjugaţi ai 17-cetosteroizilor, forme sub care aceştia sînt eliminaţi în urină, sînt compuşi solubili în apă. 17-Cetosteroizii care au gruparea hidroxil la C_3 în poziţia α, sînt eliminaţi în urină sub formă de sulfoconjugaţi, în timp ce compuşii posedînd —OH în poziţia β se întîlnesc numai sub formă de glucuronoconjugaţi.

În stările fiziologice normale, în urină se întîlnesc în cantitate mare numai α-17-cetosteroizi conjugaţi (85—95%) din totalul 17-cetosteroizilor, restul de 5—15% găsindu-se sub formă de conjugaţi ai β-17-cetosteroizilor. De semnalat că în organismul femeiesc 17-cetosteroizii urinari provin exclusiv din androgenii corticosuprarenali, în timp ce la bărbat proveniența lor este dublă, hormonii testiculari şi corticosuprarenali. Printre 17-cetosteroizii mai importanţi se numără *androsteronul, dehidroizoandrosteronul, izoandrosteronul* şi *etiocolanolonul* (fig. 12.19.)

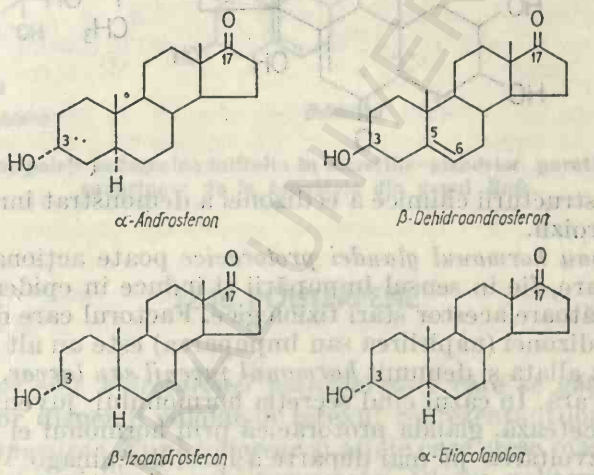


Fig. 12.19. — 17-cetosteroizii neutri din urină.

17-Cetosteroizii sînt excretaţi de asemenea sub formă de glicuronizi şi parţial de sulfaţi. Dozarea lor în urină prin tehnica lui Z i m m e r m a n n este utilizată în scopul diagnosticării hipofuncţiei glandelor suprarenale.

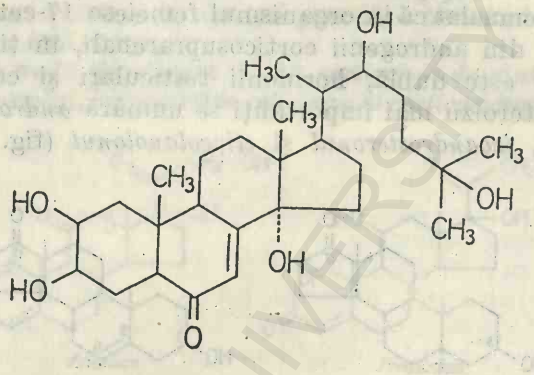
Din urină au mai fost separaţi prin diferite tehnici de analiză (cromatografie pe coloană, cromatografie pe hîrtie etc.), Δ_4-*androsten-3,17-diona, androstan-3,7-diona, etiocolanolonul, hidroxietilcolanul, 11-hidroxiandrosteronul, 11-cetoandrosteronul* şi alţii.

Producerea 17-cetosteroizilor variază în funcţie de diferiţi factori: vîrstă, sex, stare fiziologică a organismului, arsuri, intervenţii chirurgicale etc.

12.14 HORMONII INSECTELOR

În partea introductivă la acest capitol s-a arătat că hormonii sînt prezenți și la unii reprezentanți ai nevertebratelor. Cel mai bine studiați pînă în prezent sînt *hormonii insectelor*, care în mare parte au fost izolați în stare pură și parțial a fost elucidat rolul lor fiziologic. O contribuție deosebită în studiul hormonilor la insecte a fost adusă de B u t e n a n d t și de elevul său K a r l s o n (1954).

Hormonul secretat de glanda protoracică a insectelor a fost obținut în stare pură, cristalizat și numit *ecdizona*.



Stabilirea structurii chimice a ecdizonei a demonstrat înrudirea acestui hormon cu steroizii.

Ecdizona sau hormonul glandei protoracice poate acționa fie în sensul năpîrlirii larvare, fie în sensul împupării și induce în epidermă modificările corespunzătoare acestor stări fiziologice. Factorul care determină sensul acțiunii ecdizonei (năpîrlirea sau împuparea) este un alt hormon secretat de corpora allata și denumit *hormonul juvenil sau larvar*, care provoacă năpîrlirea larvară. În cazul cînd secreția hormonului juvenil de către corpora allata încetează, glanda protoracică prin hormonul ei determină împuparea și dezvoltarea pe mai departe a fazei de „imago".

12.15 BUFOGENINE

Bufogeninele sînt substanțele de tip steroidic care se întîlnesc în secrețiile glandelor sudoripare și paratiroide ale broaștelor din genul *Bufo*. La nivelul inelului *D* în poziția C_{17} bufogeninele prezintă un inel δ-lactonic de tip nesaturat, iar la C_3 și C_{14} grupări hidroxil. Bufogeninele se pot întîlni și sub formă liberă *(bufotalina)* sau sub formă de esteri ai suberilargininei și acidului acetic *(bufotoxina*, fig. 12.20). Din secrețiile eliminate de broaștele genului *Bufo* au fost separate și alte bufogenine, care se deosebesc între ele prin poziția spațială a grupărilor hidroxil. Din punct de vedere chimic bufogeninele pot fi considerate produse de oxidare

ale sterolilor. Sînt hidrolizate de o enzimă prezentă în secreţia de *Bufo bufo* sau în mediu acid, cu formare de bufotalină sau de *bufotaliena (dianhidrogenină)*.

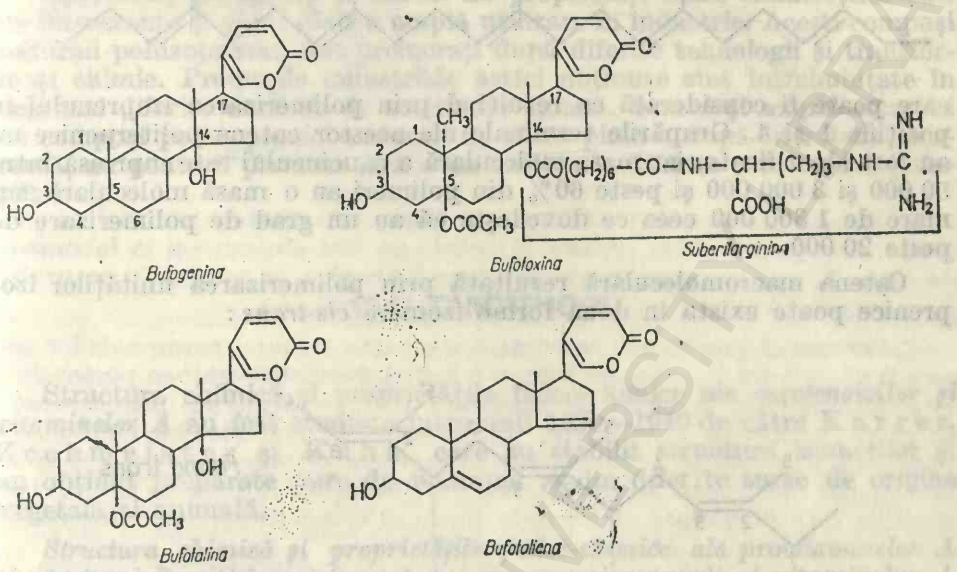


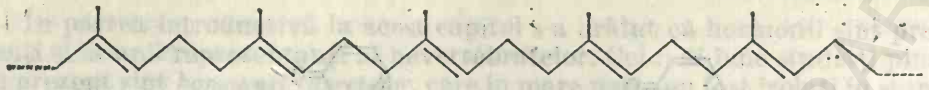
Fig. 12.20. — Principalele bufogenine întîlnite în secreţiile glandelor paratiroide şi glandelor sudoripare de la broaştele din genul *Bufo*.

12.16 POLITERPENE

Politerpenele sînt *hidrocarburi poliizoprenice* care se găsesc în natură sub forma unor dispersii coloide în latexul reprezentanţilor din familiile *Moraceae, Compositeae, Euphorbiaceae* şi altele care cresc mai ales în regiunile tropicale şi mai rar în cele temperate. Dintre politerpene cele mai importante sînt *cauciucul*, extras în cantităţi mari din plantele producătoare de cauciuc, *Hevea brasiliensis* şi din *Parthenium argentatum* şi în cantităţi mult mai mici din *Euphorbia helioscopia, Taraxacum koksaghiz* şi *Taraxacum megalorhizon, gutaperca* extrasă din coaja şi din frunzele unor reprezentanţi ai familiei Sapotaceae *(Palaquium* şi *Payena)* care cresc în Indonezia, *balata*, o politerpenă identică cu gutaperca şi izolată de la reprezentanţii Sapotaceaelor care cresc în America Centrală şi America de Sud.

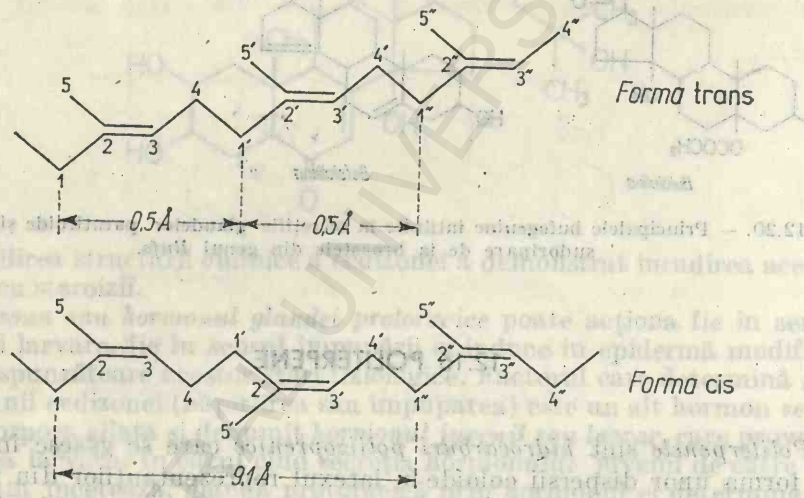
Cauciucul se găseşte în latexul ce se obţine prin crestarea scoarţei arborilor de cauciuc unde formează aproximativ 30—35% din compoziţia acestuia. Latexul mai conţine apă (60%), răşini, ceruri, proteine, elemente minerale (1,5—2,5%).

Macromoleculele de cauciuc natural conțin catene lungi cu structura următoare :



care poate fi considerată ca rezultînd prin polimerizarea izoprenului în pozițiile 1 și 4. Grupările terminale ale acestor catene politerpenice nu au fost identificate, iar masa moleculară a cauciucului este cuprinsă între 50 000 și 3 000 000 și peste 60% din polimeri au o masă moleculară mai mare de 1 300 000 ceea ce dovedește că au un grad de polimerizare de peste 20 000.

Catena macromoleculară rezultată prin polimerizarea unităților izoprenice poate exista în două forme izomere *cis-trans* :



Cauciucul natural prin încălzire nu distilă, iar la temperaturi mai mari de 300°C se descompune cu formare de *izopren*. Macromoleculele cauciucului natural au o configurație *cis*, cu o perioadă de identitate în direcția fibrei de 9,1 Å, abătîndu-se de la valoarea calculată teoretic deoarece catenele poliizoprenice sînt ușor răsucite, și atomii de C ai catenei nu sînt situați riguros în același plan. Forma *cis* alcătuiește 95% din macromolecula cauciucului natural extras din latexul de *Hevea brasiliensis* restul de 5% revenind unor catene laterale de natură vinilică prin intermediul cărora se formează legături transversale între molecule.

Gutaperca este tot un produs de polimerizare a izoprenului cu formula generală $(C_5H_8)_n$, cu o masă moleculară de aproximativ 40 000 — 50 000 și cu un grad de polimerizare de circa 600 —700. Studiul difracției razelor X pentru moleculele de gutapercă a arătat o perioadă de identitate de 4,7% și o configurație *trans* a macromoleculelor. Gutaperca

poate exista în două forme α și β care au spectre de difracție a razelor X diferite. În latexul de P a l a q u i u m g u t t a gutaperca se găsește în forma β.

Cauciucul, gutaperca și balata au proprietăți fizico-chimice deosebit de interesante și și-au găsit o amplă utilizare în industrie. Acești compuși naturali poliizoprenici sînt prelucrați după diferite tehnologii și transformați chimic. Produsele industriale astfel obținute sînt întrebuințate în cele mai diferite domenii de activitate umană. Sensul și scopul secreției de compuși poliizoprenici naturali de către plante, după literatura existentă, nu poate fi precizat fără a da naștere la diferite controverse științifice.

12.17 CAROTENOIZI

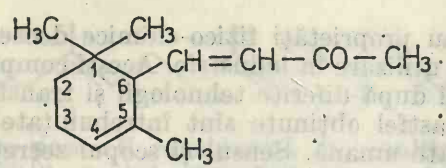
Structura chimică și proprietățile fizico-chimice ale *carotenoizilor și vitaminelor A* au fost studiate între anii 1930—1940 de către K a r r e r, Z e c h m e i s t e r și K u h n, care au stabilit structura izomerilor și au obținut preparate pure de vitamina *A* din diferite surse de origine vegetală și animală.

Structura chimică și proprietățile fizico-chimice ale provitaminelor A și carotenoizilor. Cei mai importanți precursori naturali ai vitaminelor *A* sînt: α, β și γ-*carotenii*, iar dintre carotenoizi se cunosc cel puțin șapte reprezentanți, care probabil pot fi grupați în categoria provitaminelor *A*: *criptoxantina, afanina, afanicina, mixoxantina, echinenona, leprona* și *hipoxantina.*

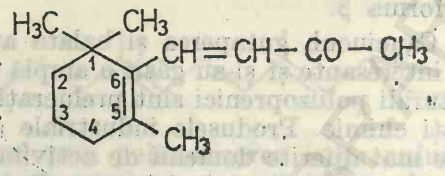
Carotenoizii, compuși organici cu 40 atomi de carbon, larg răspîndiți în regnul vegetal și animal, sînt substanțe cristaline polienice, constituite din *opt unități izoprenice.* Numărul mare de duble legături conjugate le conferă o culoare specifică, ce variază de la galben la portocaliu și de la roșu la violet. Pigmenții prezenți în tomate și în morcovi, datorită prezenței în molecula lor a dublelor legături conjugate, sînt de regulă colorați în roșu. Carotenoizii care conțin în molecula lor oxigen (de exemplu, *(xantofilele)* au o culoare galbenă. Prezența dublelor legături în molecula carotenoizilor determină o izomerie *cis-trans*, ceea ce condiționează existența numeroșilor izomeri geometrici. În general, majoritatea carotenoizilor au o configurație *trans.* Lanțul carbonic constituit din opt unități izoprenice conferă moleculei carotenoizilor solubilitatea în grăsimi, din care cauză acestea poartă și denumirea de *substanțe lipocrome.* Toți carotenoizii absorb puternic lumina în regiunea albastră și ultravio etă a spectrului. Carotenii sînt sintetizați de toate plantele cu excepția plantelor parazite și saprofite.

Cele mai importante provitamine *A* sînt: α-*carotenul*, β-*carotenul*, γ-*carotenul* și *criptoxantina.* Catena izoprenică a carotenilor se termină la cele două extremități cu două cicluri iononice, din care unul poate avea o structură α-iononică, iar celălalt este, de regulă, un ciclu β-iononic.

Ciclul β-iononic este absolut necesar pentru carotenii care îndeplinesc funcția de provitamine *A*.



α-*Ionona*

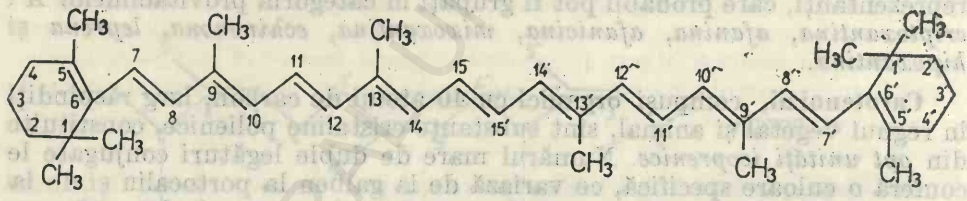


β-*Ionona*

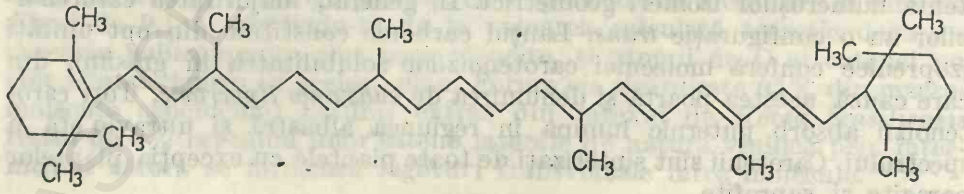
α-*Ionona* are în soluții diluate un miros caracteristic de violete. Ea a fost extrasă din *Viola odorata*. Ononele au fost obținute și în laborator de către T i m a n, identificate sub formă liberă și în produsele naturale, de exemplu în uleiul extras din *Boronia megastigma*.

β-**Carotenul** constituie cea mai mare parte a masei carotenoizilor separați din plante și a fost obținut sub formă de cristale galben-portocalii; este optic inactiv. În frunzele plantelor, unde prezența lui este mascată de către pigmenții clorofilieni, β-carotenul se găsește în cloroplaste împreună cu *clorofila*, probabil, sub forma unor complecși acvosolubili ai proteinelor sau uneori sub formă de picături lipidice. Toamna tîrziu, cînd clorofila este degradată și frunzele încep să se îngălbenească, carotenoizii devin accesibili unei observații directe.

Structura chimică a β-carotenului a fost stabilită de K a r r e r și este redată astfel* :

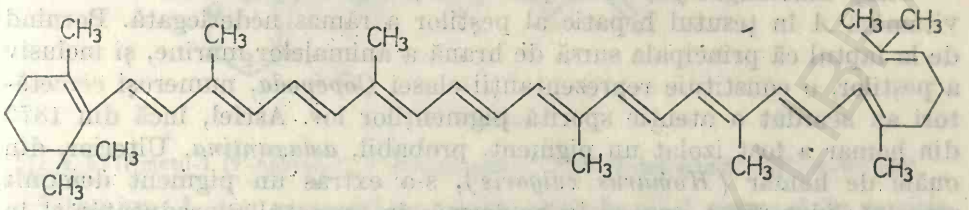


α-**Carotenul** însoțește frecvent β-carotenul în frunzele plantelor, în care poate însă să și lipsească. Astfel, de exemplu, frunzele de spanac, urzică și orz nu conțin α-caroten. Se deosebește de β-caroten prin faptul că este optic activ, iar unul din cicluri are o configurație α-iononică :



* Dacă molecula carotenului sau a carotenoidului este asimetrică atunci cu cifrele 1—15 (fără semnul prim') se notează jumătatea din moleculă care conține ciclul β-iononic (regula IUB).

γ-Carotenul este considerat însoţitor permanent al β-carotenului din plante, unde se întîlneşte în cantităţi extrem de mici. În frunzele de *Cuscuta salina* el este însă componentul carotenoidic principal. Structura γ-carotenului este următoarea:



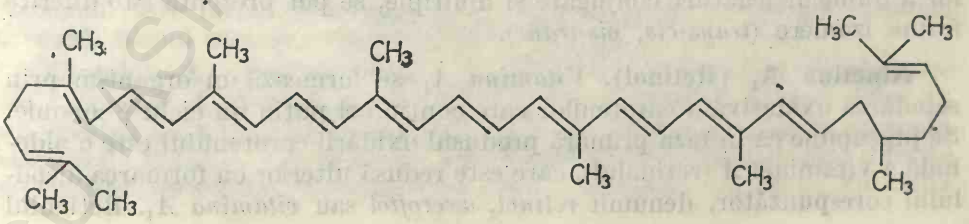
Criptoxantina este un pigment foarte răspîndit în ţesuturile vegetale în care, împreună cu β-carotenul, formează peste 30% din cantitatea totală a pigmenţilor vegetali. Din punct de vedere chimic *criptoxantina* este un 3- sau 4-hidroxi-β-caroten.

Criptoxantina a fost izolată din porumbul cu endospermul galben şi din *Physalis species*.

Echinenona. Din gonadele ariciului de mare, *Paracentrotus (Strongylocentrotus) lividus* a fost separat un pigment denumit *echinenonă*. Ulterior, echinenona a fost separată şi din gonadele şi lichidul celomic al *Echinus esculentus* şi *Echinocardium cordatum*. Pigmentul pare să fie răspîndit la alge şi la nevertebratele marine. Provenienţa lui nu este încă elucidată şi nu se cunoaşte dacă animalele sintetizează echinenona sau o primesc pe cale alimentară din algele cu care se hrănesc. G o o d w i n şi T a h a (1951) consideră că echinenona este de fapt un 4-ceto-β-caroten.

Din *Aphanizomenon flos-quase* (Cyanophyceae) au fost extraşi patru caroteni: *afanina*, *afanicina*, *afanizofila* şi *flavocina*. Ulterior s-a stabilit că afanina şi mixoxantina sînt identice ca structură chimică echinenonei separate de L e d e r e r din ouăle ariciului de mare, din care cauză se recomandă păstrarea unei singure denumiri — echinenona. Carotenoidul care predomină în frunzele plantelor este xantofila sau luteina. Xantofilele se caracterizează prin prezenţa grupărilor hidroxil la nivelul ciclurilor iononice în poziţie *p*-(para) faţă de catena nesaturată. În cantităţi mici, aproximativ 2% din cantitatea totală a xantofilelor în frunze se găseşte şi zeaxantina (1,1′)-dihidroxi-β-caroten.

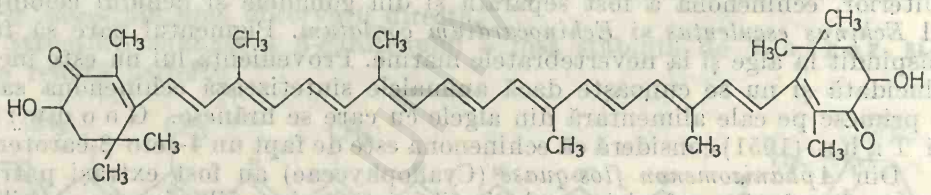
Un carotenoid aciclic, izolat din tomatele roşii (Lycopersicum sp.) care se întîlneşte şi în fructele de R o s a c a n i n a, în pepeni *(Cucumis citrallis)*, în caise *(Prunus armenica)*, ardei şi în persicul european este *licopina*, care conţine 13 duble legături din care 11 sînt conjugate:



La unele specii, de exemplu la *Lycopersicum esculentum*, cantitatea de licopină în fructe depăşeşte de 16 ori cantitatea de β-caroten. Licopina ca şi γ-carotenul care o însoţeşte în roşii, nu sînt provitamine *A*, deoarece au cele două cicluri deschise la extremitatea catenei izoprenice.

Timp îndelungat problema provenienţei cantităţilor considerabile de vitamină *A* în ţesutul hepatic al peştilor a rămas nedezlegată. Pornind de la faptul că principala sursă de hrană a animalelor marine, şi inclusiv a peştilor, o constituie reprezentanţii clasei *Copepoda*, numeroşi cercetători au acordat o atenţie sporită pigmenţilor lor. Astfel, încă din 1872 din homar a fost izolat un pigment, probabil, *astaxantina*. Ulterior, din ouăle de homar (*Homarus vulgaris*), s-a extras un pigment denumit astacină, identificat apoi şi în epidermă, în aparatul reproducător şi în sînge. Astacina este izolată sub formă cristalină din ouăle de *Maja squinado* şi este de fapt 3 : 4,3′4′-tetraceto-β-caroten.

În 1938 Kuhn şi Sörensen arată că astacina nu se întîlneşte în condiţii naturale şi este de fapt un artefact, care se formează datorită oxidării pigmentului natural — *astaxantina* — carotenoidul cel mai bogat în oxigen, prezent la reprezentanţii *Schizopodelor*, *Isopodelor*, *Amphipodelor* etc.

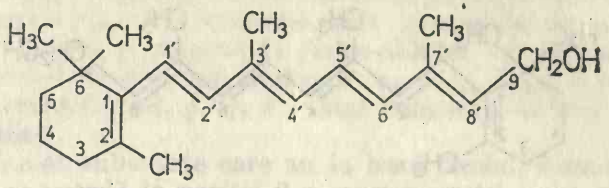


Importanţa biologică a carotenoizilor. Pe lîngă rolul de pigmenţi vegetali şi de provitamine (pentru mamifere), carotenoizii îndeplinesc în plantă şi alte funcţii importante : intervin în procesul de fotosinteză şi împreună cu clorofila participă la biosinteza din cloroplaste, din organitele microscopice prezente în celula vegetală unde joacă un rol important în procesul fotosintezei.

Vitamina *A* nu se întîlneşte decît în regnul animal. În prezent se cunosc mai multe vitamine *A* : *vitamina* A_1 *sau retinol*, *neovitamina A*, *vitamina* A_2 şi numeroase produse de oxidare, hidratare şi dehidrogenare a acestora. Pe de altă parte, vitaminele *A*, datorită prezenţei în structura lor a dublelor legături conjugate şi multiple, se pot prezenta sub diferite forme izomere (*trans-cis*, *cis-trans*).

Vitamina A_1 (Retinol). *Vitamina* A_1 se formează în organism prin scindarea oxidativă a carotenilor care conţin cel puţin un ciclu β-iononic. Se presupune că în faza primară produsul oxidării carotenului este o aldehidă a vitaminei *A* (retinalul), care este redusă ulterior cu formarea alcoolului corespunzător, denumit *retinol*, *axeroftol* sau *vitamina* A_1. Retinolul

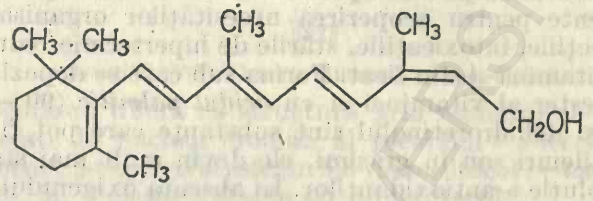
poate fi esterificat și depozitat de organism, sub formă de ester, în ficat. Structura chimică a retinolului este redată schematic astfel:



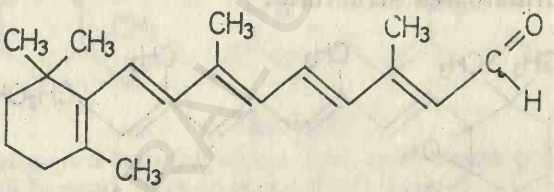
Retinol

(2, 6, 6'-Trimetil-1 (9'-hidroxi-3', 7'-dimetil-nona-1', 3', 5'- 7'-tetraetenil) ciclohexen-1-en)

Vitamina A_1 sau retinolul are o funcție alcoolică primară în poziția *trans* și o configurație *trans-trans*, spre deosebire de *neovitamina A*, care posedă o grupare alcoolică primară în poziția *cis* și o configurație *trans-cis*:



Este probabil ca forma sub care se află vitamina A să fie forma acidă, denumită și *acid retinoic*. Totuși, retinolul nu poate îndeplini funcția vitaminei *A* în procesul vederii, la care participă aldehida corespunzătoare vitaminei A_1 — retinalul sau retinal aldehidă:

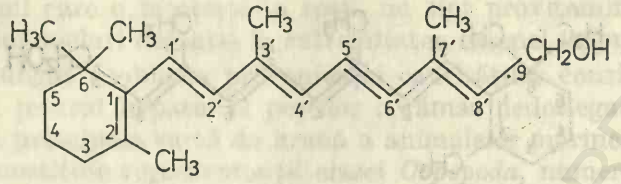


Retinal (trans-trans)

Retinolul conține un ciclu β-ononic și cinci duble legături conjugate. Prin hidrogenare se transformă în perhidroxivitamina *A*. Retinolul cristalizează la temperaturi foarte joase din metanol, iar cristalele de culoare gălbuie sînt optic inactive. Este relativ termostabil în prezența oxigenului și în soluții cloroformice, în prezența triclorurii de stibiu, se colorează în albastru, soluția posedînd un spectru de absorbție caracteristic la 620 nm. Retinolul este insolubil în apă, însă ușor solubil în cloroform, benzen, acetonă, alcool metilic, eter etilic și în grăsimi.

Vitamina A_2 (Dehidroretinol). S-a observat că soluțiile cloroformice ale vitaminei *A* extrase din țesutul hepatic al *peștilor de apă dulce* au un spectru de absorbție la lungimea de undă de 351 nm, iar în prezența clorurii de stibiu la $\lambda = 693$ nm. Ambele spectre de absorbție sînt diferite de spectrul de absorbție caracteristic pentru vitamina A_1. Noua vitamină

a fost denumită vitamina A_2 sau *dehidroretinol* și are următoarea structură chimică :

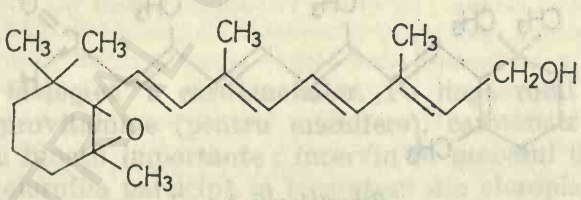


Retinol

Forma aldehidică a dehidroretinolului poartă denumirea de *3-dehidroretinol* (3-dehidroretinolaldehida), iar forma acidă — de *acid 3-dehidroretinoic.*

Vitamina *A* se depozitează în ficat, în timp ce carotenii se depun cu precădere în țesutul adipos. Se apreciază că rezervele hepatice de vitamină *A* sînt suficiente pentru acoperirea necesităților organismului pe timp de un an. Infecțiile, intoxicațiile, stările de hipertermie reduc considerabil rezervele de vitamină *A* din ficat. Forma sub care se depozitează în hepatocit este de ester al vitaminei *A* cu *acidul palmitic* (90—95%).

Retinolul și dehidroretinolul sînt substanțe care pot fi ușor oxidate. Dizolvate în uleiuri sau în grăsimi, ele devin mult mai stabile, datorită prezenței în soluție a antioxidanților. În absența oxigenului, vitaminele *A* sînt stabile și termostabile, chiar și la temperaturi mari. Razele ultraviolete și sursele luminoase distrug vitaminele *A*, din care cauză se recomandă conservarea lor în sticle brune sau în încăperi obscure. Produsul rezultat după oxidarea vitaminei A_1, *epoxi-5,6-retinolul* a fost izolat din *retina pupilis* și are următoarea structură :



12.18 TOCOFEROLII ȘI FILOCHINONELE *

12.18.1 Vitaminele E sau tocoferolii

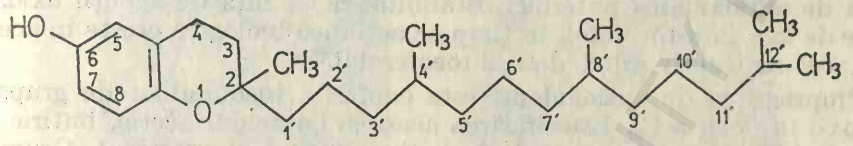
Tocoferolii (*tokos* = progenitură, *ferein* = a naște) sînt substanțe liposolubile, larg răspîndite în regnul vegetal, unde sînt sintetizate, probabil, în frunzele verzi care conțin un alcool superior *fitolul.* Semințele cerea-

* În text sînt utilizate denumirile recomandate de IUB. Termenii sinonimi pentru vitaminele *E* sînt : *vitaminele fertilității, vitaminele antisterilității, reproducerii,* iar pentru *vitaminele K — vitaminele coagulării, antihemoragice* sau *factorul protrombinic.*

lelor și, îndeosebi, embrionul lor, conțin importante cantități de tocoferol. În *organismul animal* și la *om* tocoferolii se găsesc în cantități relativ mici în *unele organe (mușchi, rinichi, inimă și ficat)* și sînt de proveniență exogenă, deoarece aceste organisme sînt incapabile de a le sintetiza.

Structură chimică și proprietăți fizico-chimice. Se cunosc șapte vitamine *E* cu o structură chimică analoagă : α, β, γ, δ, ε, ξ, și η-tocoferoli. Primii patru tocoferoli -α, β, γ, δ — sînt cunoscuți de mai mult timp și mai bine studiați.

Tocoferolii sînt substanțe care au la bază *tocolul*, format din nucleul 6-oxicroman, ce posedă în poziția 2 o grupare metil și un radical alifatic format din 16 atomi de carbon :

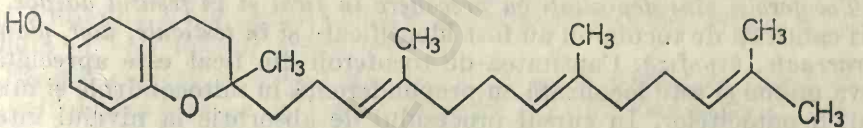


Tocol

(2-metil-2 (4′(8′, 12 trimetiltridecil) croman-6-ol)

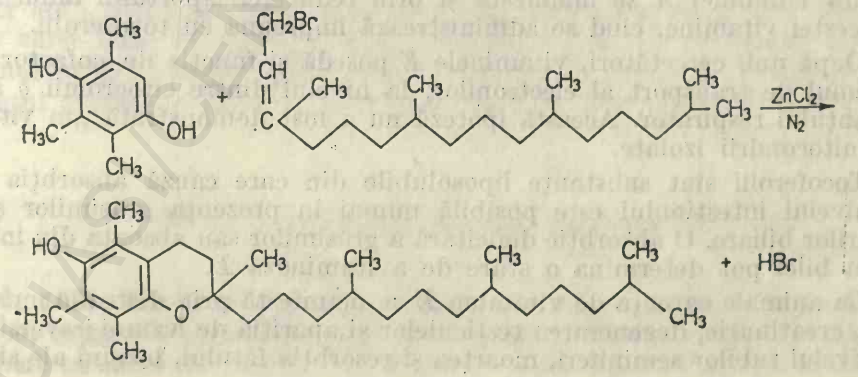
Diverșii tocoferoli diferă ca structură prin numărul și poziția grupărilor metil grefate la nucleul croman al tocolului : *α-tocoferolul* este un 5,7,8-trimetiltocol ; *β-tocoferolul* este un 5,8-dimetiltocol ; *γ-tocoferolul* este un 5,7-dimetiltocol, iar *δ-tocoferolul* este un 8-metiltocol.

ε-tocoferolul și *ξ-tocoferolul* sînt feroli derivați de la tocotrienol și reprezintă de fapt *5,8-dimetiltocotrienol* și respectiv *5,7,8-trimetiltocotrienol*. Structura tocotrienolului este următoarea :



Tocotrienol

Structura chimică a tocoferolilor a fost confirmată prin sinteză în laborator, realizată în anul 1938 de către K a r r e r și a l ț i i, prin condensarea trimetilhidrochinonei cu bromura de fitil în prezența clorurii de zinc și în mediu de benzen :



Reacţia decurge în atmosferă de azot, la temperatura de 60—70°C şi după completa degajare a HBr produsul este spălat cu apă şi purificat prin cromatografie pe coloană de Al_2O_3.

Bromura de fitil se obţine din alcoolul superior nesaturat *fitol*, răspîndit în regnul vegetal, unde însoţeşte clorofila.

α şi γ-Tocoferolii au fost obţinuţi în stare cristalizată. Restul tocoferolilor se prezintă sub formă uleioasă. Sînt substanţe optic active, termolabile în prezenţa oxigenului, însă stabile în absenţa acestuia. Tocoferolii, α, β, γ, şi δ posedă spectre de absorbţie în ultraviolet caracteristice pentru fiecare în parte.

Tocoferolii sînt substanţe autooxidabile, fapt care le conferă proprietatea de antioxidanţi puternici. Stabilitatea lor faţă de agenţii oxidanţi scade de la γ la α-tocoferol, în timp ce acţiunea biologică creşte în acelaşi sens, cel mai activ fiind deci α-tocoferolul.

Proprietatea de antioxidanţi este conferită tocoferolilor de gruparea hidroxil în poziţia C_6. Esterificarea acesteia cu acidul acetic, butiric sau fosforic dă compuşi cu o activitate antioxidantă mai puternică. Gruparea hidroxil nu este necesară pentru manifestarea activităţii biologice a tocoferolilor. *De o importanţă deosebită pentru activitatea vitaminică a tocoferolilor sînt catena laterală şi numărul grupărilor metil, substituite la ciclul benzenic.* Amputarea catenei laterale sau substituirea ei cu o grupare metil duce la pierderea completă a activităţii vitaminice, în timp ce numărul grupărilor metil este direct legat de intensitatea acestei activităţi. Tocoferolul cu cea mai mare activitate vitaminică este α-tocoferolul; β- şi γ-tocoferolii posedă numai 1/2 din activitatea acestuia, iar δ-tocoferolul este de 100 ori mai puţin activ.

Tocoferolii sînt depozitaţi cu precădere în ficat şi în ţesutul adipos, dar mari cantităţi de tocoferoli au fost identificate şi *în testicule, uter, glandele suprarenale, hipofiză.* Cantitatea de tocoferoli din ficat este apreciată la cîteva grame şi este localizată cu preponderenţă în mitocondriile şi microsomii hepatocitelor. În cursul procesului de absorbţie la nivelul intestinului esterii tocoferolului prezenţi în alimente sînt hidrolizaţi şi absorbiţi în prezenţa bilei.

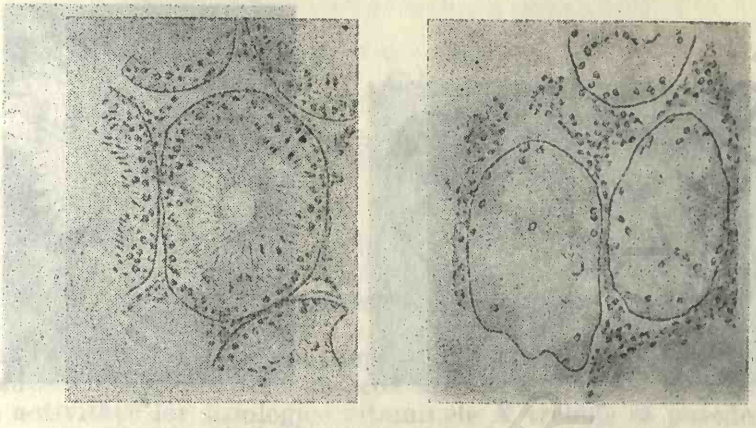
Acţiunea fiziologică. Vitaminele *E* îndeplinesc rolul de antioxidanţi puternici, preîntîmpină oxidarea vitaminelor *A*, a acizilor graşi nesaturaţi, a acidului ascorbic şi a lipidelor. Efectul protector al tocoferolilor asupra vitaminei *A* se manifestă şi prin reducerea aportului alimentar al acestei vitamine, cînd se administrează împreună cu tocoferolii.

După unii cercetători, vitaminele *E* posedă şi funcţia de cofactori în sistemul de transport al electronilor, la nivelul dintre citocromii *b* şi *c* ai lanţului respirator. Această ipoteză nu a fost demonstrată „in vitro" pe mitocondrii izolate.

Tocoferolii sînt substanţe liposolubile din care cauză absorbţia lor la nivelul intestinului este posibilă numai în prezenţa grăsimilor şi a sărurilor biliare. O absorbţie deficitară a grăsimilor sau absenţa din intestin a bilei pot determina o stare de avitaminoză *E*.

La animale carenţa de vitamina *E* se manifestă prin distrofie musculară, creatinurie, degenerarea testiculelor şi apariţia de leziuni ireversibile la nivelul tubilor seminiferi, moartea şi resorbţia fătului, leziuni ale siste-

melor muscular și nervos (fig. 12.21). La șobolanii albi pe lîngă aceste simptome carența de vitamină *E* poate accentua leziunile hepatice, care sînt specifice lipsei de cistină din alimente. Vitaminele *E* și un *„factor 3"* de natură organică ce conține seleniu, descoperit de S c h w a r t z (1954—



a *b*

Fig. 12.21. — Avitaminoza *E* la șobolanul mascul.
a.—aspectul normal al tubilor seminiferi; b.—aspectul tubilor seminiferi în avitaminoza *E* (după K u d r j a s c h o v).

1960), sînt capabile să prevină leziunile hepatice de natură necrotică. „Factorul 3" se pare că are o acțiune sinergică cu vitamina *E* și cu cistina. Vitamina *E* favorizează acțiunea acestui factor, însă acesta nu poate stimula și nici înlocui vitaminele *E*.

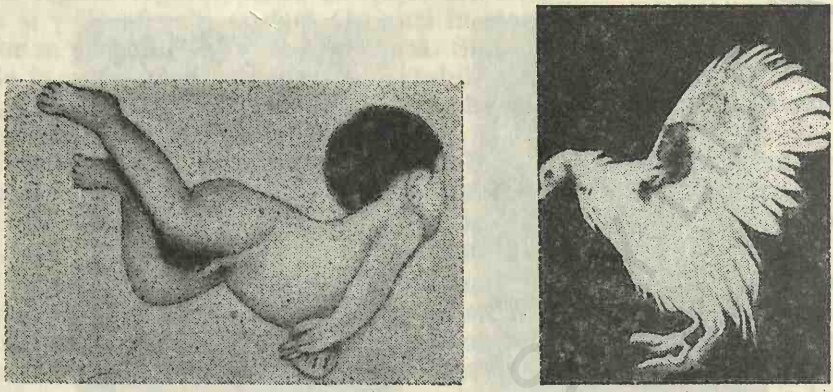
Efectul curativ exercitat de cistină în cazul necrozelor hepatice este atribuit de S c h w a r t z tot „factorului 3", care este prezent în preparatele de cistină sub formă de impurități. La om nu s-a precizat, pînă în prezent, existența unei avitaminoze *E*, semnalîndu-se numai un nivel scăzut al tocoferolilor în plasma sanguină în timpul unor boli ale pancreasului și ficatului.

Răspîndire în natură. Legumele, salata verde, uleiurile vegetale (uleiul de soia, uleiul extras din germenii de grîu și de porumb, uleiurile de palmier etc.), semințele gramineelor, laptele, ouăle, peștele și alte alimente sînt surse bune de vitamina *E*. Necesitățile zilnice ale omului în aportul alimentar de tocoferoli nu au putut fi stabilite, însă sînt în funcție de conținutul grăsimilor în alimente și sînt estimate între 10 și 30 mg/24 ore.

12.18.2 Vitaminele K sau filochinonele

În 1929, D a m a constatat că la puii de găină hrăniți cu o dietă sintetică, compusă din amidon, cazeină, săruri minerale, extract de drojdie de bere ca surse de vitamine *B* și din celuloză, apar hemoragii la nivelul

tractului gastro-intestinal și în mușchi (figura 12.22). Adăugarea de vitamine *A* și *D* la dietă nu are nici un efect, în timp ce semințele de graminee au un efect curativ. D a m demonstrează că hemoragia este cauzată de absența din alimente a unui factor, diferit ca structură și proprietăți de



a *b*

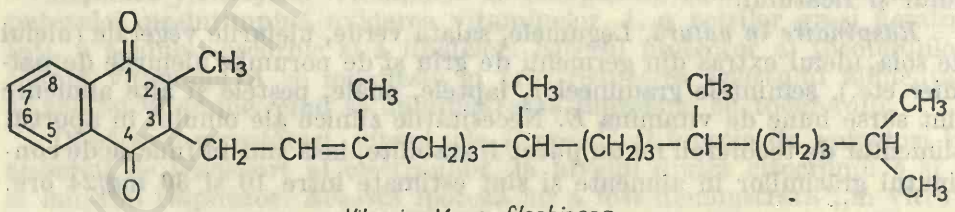
Fig. 12.22. — Avitaminoza *K* la păsări și la om.
a. — la copii avitaminoza *K* este însoțită de hemoragii acute interne și de stări de tetanie. b. — la păsări, hemoragiile sînt localizate și ușor vizibile în regiunea aripilor după Z b a r s k i, I v a n o v și M a r d a s h e v).

vitaminele *A*, *D* și *E*, pe care-l denumește factor de coagulare sau vitamină *K* (Koagulation-vitamin).

Ulterior, vitamina *K* a fost izolată din lucernă, din făină de pește alterată, din plantele verzi etc.

Structură chimică și proprietăți fizico-chimice. Preparatele de vitamină *K* obținute din lucernă și din făină de pește intrată în putrefacție s-au dovedit a fi substanțe cu structură chimică diferită. Structura lor chimică a fost stabilită în 1939—1940 și s-a demonstrat că sînt derivați de la naftochinonă.

Vitamina *K* de origine vegetală a fost denumită vitamina K_1 și are următoarea structură:

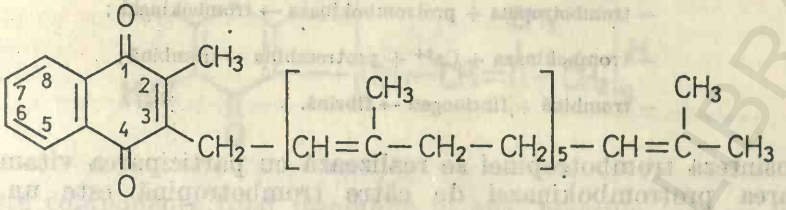


Vitamina K_1 sau filochinona
(2-Metil-3-fitil-1,4-naftochinona)

Structura chimică a vitaminei K_1 a fost confirmată prin sinteza ei în laborator, care s-a realizat din condensarea 2-metil-1, 4-naftochinonei cu fitolul, în prezența unui catalizator sau din 2-metil-1, 4-naftohidrochinonă în prezența unui acid (acid tricloracetic sau acid oxalic).

În privința vitaminei K_2 obținută din făină de pește intrată în putrefacție trebuie menționat faptul că ea este sintetizată de bacteriile de putre-

facție, deoarece în făina de pește proaspătă nu se întîlnește. În sprijinul originii bacteriene a vitaminei K_2 pledează și faptul că *Bacterium coli* din flora intestinală a omului sintetizează importante cantități de vitamină K_2. Structura vitaminei K_2 este următoarea:



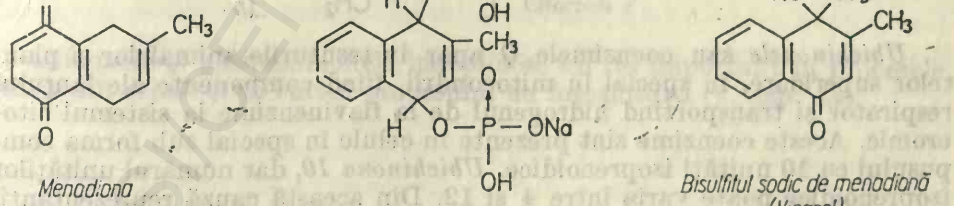
Naftochinona *Radical difarnezil*

Vitamina K_2 sau farnochinona
(2-Metil-3-difarnezil-1,4-naftochinona)

Experiențele efectuate cu preparatele pure din vitamine K și cu derivați substituiți ai acestora au scos în evidență faptul că pentru menținerea activității lor fiziologice vitaminele K trebuie să posede un nucleu benzenic nealterat, iar în poziția 2 o grupare metil. Substituirea catenei laterale modifică într-un oarecare grad intensitatea activității vitaminice.

Vitaminele K_1 și K_2 sînt uleioase, de culoare gălbuie și la temperaturi scăzute (−20°C) cristalizează. Sînt insolubile în apă, însă solubile în acetonă, pentan, benzen, alcool absolut și eter. Vitamina K este optic activă: $[\alpha]_D^{22} = -0{,}71°$ și posedă o fluorescență roșie caracteristică, care sub influența razelor ultraviolete trece ireversibil în verde intens, dovadă că radiațiile UV distrug vitaminele K. În soluții acide vitaminele K sînt termostabile, însă în mediu alcalin, la cald, se descompun. Vitaminele K posedă proprietăți oxido-reducătoare (v. mai departe).

Alte vitamine K. Oxidarea cu acid cromic a 2-metilnaftalinei dă naștere la 2-metil-1,*4-naftochinonă*, *menadionă* sau *vitamina* K_3 care are proprietățile vitaminei K_1. De la menadionă s-au obținut derivați, care sînt ușor solubili în apă și de aproximativ 3 ori mai puțin toxici:



Menadiona *1,4-Difosfatul monosodic de menadionă* *Bisulfitul sodic de menadionă (Vicasol)*

Acțiunea fiziologică a vitaminelor K. Funcția cea mai bine cunoscută a vitaminelor K este de a cataliza sinteza de protrombină din țesutul hepatic. În absența vitaminelor K cantitatea de protrombină scade mult

— *hipoprotrombinemia* — ceea ce mărește mult timpul de coagulare a sîngelui, provocînd hemoragii.

După K u d r e a ș o v (1948) coagularea sîngelui decurge în trei etape:

— trombotropina + protrombokinaza → trombokinaza;

— trombokinaza + Ca^{2+} + protrombina → trombină;

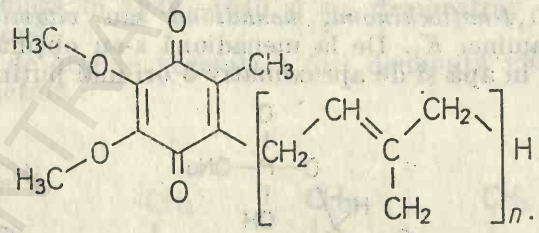
— trombină + fibrinogen → fibrină.

Biosinteza trombotropinei se realizează cu participarea vitaminei *K*. Activarea protrombokinazei de către trombotropină este un proces care manifestă specificitatea de specie. Protrombina, după părerea lui F o r g a c s (1954) este sintetizată în ficat sub formă inactivă de protrombinogen, pentru a cărui activare este necesară prezența unui „factor *X*"; pentru sinteza acestuia vitamina *K* este absolut necesară.

Ultimele cercetări (1963) atribuie vitaminelor *K* o participare importantă în procesele de fosforilare oxidativă. Mitocondriile izolate din ficatul de șobolan și iradiate cu raze *UV* posedă o capacitate de fosforilare oxidativă redusă, care poate fi însă restabilită dacă se adaugă vitamina *K*. M a r t i u s consideră că vitaminele *K* îndeplinesc rolul de cofactori în procesele de fosforilare oxidativă.

12.19 UBICHINONE

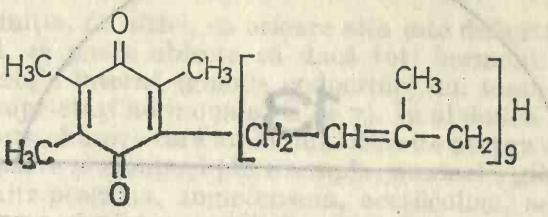
Ubichinonele sînt substanțe care conțin în structura lor *n* unități izoprenice și un nucleu derivat de la hidrochinonă. Ele îndeplinesc în organism rolul de coenzime. În principiu structura lor poate fi redată astfel:



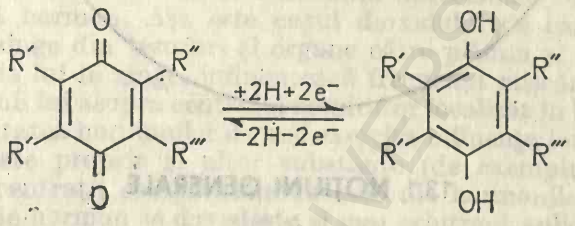
Ubichinonele sau coenzimele *Q* apar în țesuturile animalelor și plantelor superioare, în special în mitocondrii, fiind componente ale lanțului respirator și transportînd hidrogenul de la flavinenzime la sistemul citocromic. Aceste coenzime sînt prezente în celule în special sub forma compusului cu 10 unități izoprenoidice, *Ubichinona 10*, dar numărul unităților izoprenoidice poate varia între 4 și 12. Din această cauză reprezentanții individuali ai ubichinonelor sînt denumiți ubichinona 6, ubichinona 8, ubichinona 12 etc.

Din plastidele celulelor vegetale a fost extrasă o ubichinonă, *coenzima* Q_{254} (deoarece are o absorbție maximă la 254 nm), care a fost denumită ulterior *plastochinonă*. Această substanță se deosebește de coenzimele *Q*

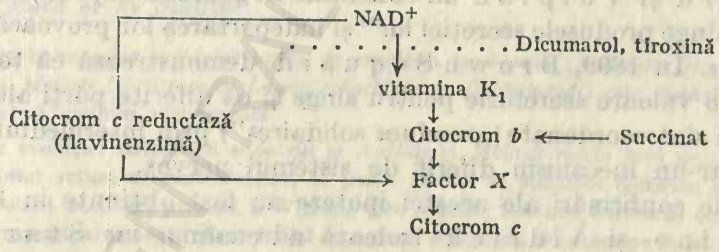
prin aceea că în poziţiile 4 şi 5 ale nucleului naftochinonic sînt prezente două grupări metil (în locul grupărilor metoxi) şi are structura :



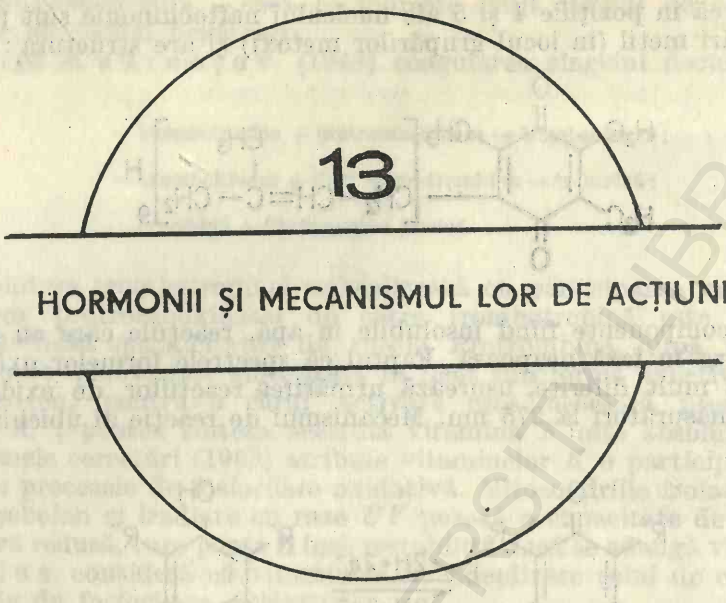
Aceste componente fiind insolubile în apă, reacţiile care au loc „in vivo" decurg în fază neapoasă. Faptul că spectrele formelor oxidată şi redusă sînt mult diferite, uşurează urmărirea reacţiilor de oxido-reducere, prin măsurători la 275 nm. Mecanismul de reacţie al ubichinonelor este :



M a r t i u s şi N i t z - L i t z o w (1953 ; 1954) au demonstrat că antagoniştii vitaminelor *K*, adăugaţi „in vitro" micşorează viteza fosforilării oxidative, ceea ce i-a determinat să formuleze ipoteza participării vitaminelor *K* în respiraţia celulară conform schemei :



Chinonele şi plastochinonele îndeplinesc un rol important în procesele redox din celule şi în cursul procesului de fotosinteză (v. cap. 14).



13

HORMONII ȘI MECANISMUL LOR DE ACȚIUNE

13.1 NOȚIUNI GENERALE

Primele încercări de a evidenția existența în organismele vii a unor compuși chimici, capabili să influențeze fiziologia unor organe se situează în jurul anilor 1849—1855, cînd Berthold, Addison, Brown-Séquard și Vulpian au constatat că glandele suprarenale „varsă direct în sînge produsele secreției lor" și îndepărtarea lor provoacă moartea animalelor. În 1899, Brown-Séquard demonstrează că toate țesuturile au o valoare secretorie pentru sînge și că diferite părți ale organismului viu sînt coordonate („rendues solidaires") prin intermediul sîngelui, deci printr-un mecanism diferit de sistemul nervos.

Primele confirmări ale acestei ipoteze au fost obținute în 1901 cînd Takamine și Aldrich izolează adrenalina, iar Starling și Bayliss demonstrează că, extractul clorhidric obținut din mucoasa intestinală declanșează secreția de suc pancreatic. În 1905, Starling propune pentru aceste substanțe termenul de *hormon*. Această denumire avea să stîrnească ample și vii dispute ale căror ecouri nu s-au stins nici pînă azi. Într-adevăr, cum se definesc hormonii? Care sînt particularitățile lor de structură și de acțiune care permit cercetătorului să-i identifice și să-i diferențieze fără greș de celelalte substanțe din organism (vitamine, enzime)?

Hormonii sînt definiți, în general, drept substanțe chimice specifice, elaborate de țesuturi glandulare specializate și organizate (glande cu secreție

internă), eliminate în sînge și vehiculate de acesta către diferite organe și țesuturi asupra cărora își exercită acțiunea lor specifică, în concentrații foarte mici *.

Această definiție, de altfel, ca oricare alta este deficitară și restrictivă. În primul rînd, se poate obiecta că dacă toți hormonii sînt produși de glandele cu secreție internă (glande endocrine), nu toate produsele endocrine au însă proprietăți hormonale (G l e y). În al doilea rînd, din această clasă de substanțe chimice care au acțiuni diferite asupra diverselor organe și țesuturi fac parte și compuși (de exemplu, auxinele, gibberillinele, kinetinele, 5-hidroxitriptamina, angiotensina, acetilcolina, acidul γ-aminobutiric ș.a.m.d.) care nu sînt secretați la nivelul glandelor endocrine sau în țesuturi constituite în entități anatomice distincte. În al treilea rînd, hormonii sînt secretați în unele cazuri și de unele glande cu secreție exocrină care au deci canale de excreție a incretelor lor, de exemplu, pancreasul și glandele sexuale**. În sfîrșit, trebuie subliniat faptul că nu orice substanță care pătrunde în sînge dintr-un țesut sau organ și care poate influența activitatea altui organ situat la o distanță apreciabilă, topografic, poate fi considerată hormon. Așa este cazul dioxidului de carbon care este vehiculat de sînge din țesuturi și organe către plămîn și care, în funcție de concentrația lui în sînge, influențează frecvența mișcărilor respiratorii datorită acțiunii lui asupra centrului respirator localizat în bulbul rahidian.

Particularitatea hormonilor de a-și exercita influența lor în concentrații foarte mici este proprie și altor substanțe (de exemplu, vitaminelor), active la concentrații comparabile cu cele ale hormonilor.

Noțiunea de hormon se dovedește și mai arbitrară aplicată la nevertebrate, unde delimitarea neurosecreției de hormonii propriu-ziși devine în cazul unor clase sau reprezentanți (specii) adesea practic imposibilă.

Din aceste motive, în prezent, sub denumirea de hormoni sînt reunite substanțe eterogene din punct de vedere chimic, mai bine cunoscute în cazul omului și a vertebratelor superioare și insuficient studiate la animalele inferioare și la plante.

Prezența hormonilor la nevertebrate, de exemplu, la *Anelide* (*Polichete, Oligochete, Hirudianee*) și la *Moluște* (*Gasteropode, Lamellibranchiate* și *Cephalopode*) este astăzi confirmată experimental și unanim recunoscută.

Etapele evoluției sistemului endocrin la *Anelide* și *Moluște* rămîn încă puțin cunoscute, însă, în stadiul actual al cunoștințelor, se poate afirma că aparatul endocrin al moluștelor este mai evoluat decît cel prezent la *Viermi*, care posedă sistemul hormonal cel mai simplu (celula neurosecretoare constituie ea însăși un aparat endocrin), deoarece pe lîngă celulele neurosecretoare își fac apariția organele endocrine (de exemplu, glanda optică a Cephalopodelor). Activitatea endocrină a celulelor neurosecretoare prezente la *Anelide* și *Moluște* este influențată de stimuli luminoși. Pentru prima dată un fenomen, care era considerat specific numai animalelor superioare — păsări și mamifere — se întîlnește la nevertebrate. Mai mult, se presupune, pe baza unor date experimentale încă puține la număr, că adaptarea la *Cephalopode Gasteropode, Lamellibranchiate* și *Hirudineae* sînt fenomene influențate și reglate pe cale endo-

---

* Hormonii mai sînt definiți drept *mesageri chimici, reglatori chimici* sau *excitanți funcționali specifici* (S t a r l i n g)

** Și în aceste cazuri, hormonii sînt vehiculați tot de fluxul sanguin, ei nu sînt eliminați prin canale în cavități sau pe suprafețele organelor.

crină. Procesele de reproducere și regenerare sînt, de asemenea, influențate pe cale endocrină. La nevertebrate, de exemplu, la *Protozoare* procesul de cuplare-conjugare este controlat de substanțe chimice specifice, eliminate în mediu sub formă de gameți. *Blepharisma intermedium* elimină în mediu doi gameți sau gamini: gamon *I* și gamon *II* sau factorul *R*. Ultimul a fost recent studiat de K u b o t a, T o k o r o y a m a, T s k u d a, K o y a m a (1973) cu ajutorul metodelor spectroscopice și de difracție a razelor *X* și a fost identificat drept *lactat 3 (2'-formilamino-5'-hidroxibenzoil) de calciu*, denumit și *blefarismina*, cu formula brută: $C_{11}H_{10}NO_6 \cdot 0{,}5\ Ca \cdot 1{,}5\ H_2O$.

Produsele de excreție care se prezintă sub forma unor granule cu un diametru cuprins între 1 000 și 3 000 Å, par a se forma în cursul unui proces asemănător formării secrețiilor glandelor exocrine. Aceste produse după părerea unor autori (S a k h a r o v și alții, 1965) pot acționa fie ca hormoni, fie ca mediatori chimici. Această ipoteză se bazează pe observația că, la *Anelide* și *Moluște* a fost demonstrată experimental secreția de *adrenalină*, *acetilcolină* și *5-hidroxitriptamină*.

Trăsătura cea mai caracteristică a hormonilor rezidă, posibil, în aceea că ei influențează viteza transformărilor biochimice la nivel celular, dar nu pot iniția reacții biochimice; toți hormonii sînt sintetizați și secretați permanent, au o acțiune fiziologică rapidă, după care sînt imediat inactivați, din care cauză durata existenței lor în organism (perioada de înjumătățire sau „half life") este relativ scurtă.

O privire de ansamblu asupra hormonilor și a substanțelor hormonasemănătoare este redată în tabelul 13.1, din care reiese clar că o clasificare a acestora după structura lor chimică, după locul lor de acțiune sau după procesele metabolice pe care le influențează poartă întotdeauna o notă de convențional.

Elaborarea hormonilor în organismele vii are la bază, în mod obligatoriu, un proces de sinteză intracelulară. La om și la mamiferele superioare, procesele de secreție au loc la nivelul unor celule specializate, grupate în formațiuni morfologice distincte, denumite *glande*. Glandele după modalitatea de eliberare în mediul extern a produselor secretorii se împart în *glande exocrine* (elimină secrețiile la nivelul suprafețelor externe și (sau) interne ale organismului printr-un sistem de canale) și *glande endocrine* (elimină incretele lor direct în mediul intern al organismului, sînge, limfă, lichid cefalorahidian).

Transportul produselor de secreție ale glandelor endocrine pe calea sanguină poartă denumirea de *hemocrinie*, cu ajutorul limfei — *limfocrinie*, al lichidului cefalo-rahidian — *hidroencefalocrinie* (hipofiza posterioară), iar cînd transportul se realizează de-a lungul fibrelor nervoase — *neurocrinie*, iar prin lichidul interstițial, din aproape în aproape — *topocrinie*.

Transportul hormonilor cu ajutorul sistemelor circulator și nervos, constituie pentru mamifere și pentru om două căi majore prin care se asigură transmiterea informației de la un organ la altul, integrarea proceselor metabolice și biochimice în multitudinea reacțiilor care asigură un echilibru armonios și o bună funcționare a întregului orga ism. Ruperea acestui echilibru este întotdeauna însoțită de apariția unor grave modificări metabolice, care uneori pot fi studiate experimental sau pe cazuri clinice, a căror cunoaștere și caracterizare ajută la stabilirea mai exactă a limitelor dintre normal și patologic. Această fină și permanentă

Clasificarea hormonilor și a substanțelor hormon-asemănătoare după structura lor chimică *

Clasa de hormoni	*Denumirea hormonului și glanda endocrină sau organul în care se sintetetizează*	*Principalul loc de acțiune al hormonilor*	*Procesele metabolice pe care le influențează*
a	*b*	*c*	*d*
A. — *Hormoni și substanțe hormon-asemănătoare de natură polipeptidică și proteică*	*1. — HIPOTALAMUS* Factorii de reglare sintetizați de hipotalamusul mamiferelor	Hipofiza (lobul anterior și lobul intermediar)	Sinteza și eliberarea hormonilor hipofizari
	2.— ADENOHIPOFIZA a) Adrenocorticotrop (ACTH) sau *corticotropina*	Partea corticală a glandei suprarenale. Țesutul adipos.	Biosinteza și (sau) secreția de hormoni steroizi corticosuprarenali. Punerea în circulație a lipidelor
	b) *Somatotropina*, hormonul somatotrop (STH)	Acțiune generală asupra organismului	Creșterea si dezvoltarea sistemelor muscular și osos; efecte anabolizante asupra metabolismului Ca^{2+}, P și N, glucidelor și lipidelor
	c) *Lutropina* sau hormonul luteinizant sau stimulator al celulelor interstițiale (LH sau ICSH)	Ovare și testicule	Secreția de hormoni androgeni și de progesteron; dezvoltarea țesutului interstițial
	d) *Follitropina* sau hormonul foliculostimulator (FSH)	Ovare și testicule	Dezvoltarea foliculilor lui Graaf și a tubilor seminiferi; secreția de hormoni estrogeni și controlul ovulației; spermatogeneza
	e) *Prolactina* sau hormonul mamotropic	Glanda mamară. Corpul galben.	Proliferarea corpului galben, secreția de progesteron; inițierea secreției de lapte și dezvoltarea glandelor mamare
	f) *Tirotropina* sau hormonul tirotrop	Tiroida. Țesutul adipos	Biosinteza și secreția hormonilor tiroidieni. Punerea în circulație a lipidelor

* Denumirile scrise cu litere cursive sînt cele acceptate și recomandate de comisiile reunite ale IUPAC și IUB pentru nomenclatura în biochimie (1975) v. J. Biol. Chem., 250, 3215)

TABELUL 13.1 (continuare)

a	b	c	d
	3. — *NEUROHIPOFIZA**		
	a) *Vasopresina* sau hormonul antidiuretic (ADH)	Arteriole Tubulii renali	Presiunea sanguină. Reabsorbția apei
	b) Coherina	Musculatura netedă din intestin	Asigură mișcarea peristaltică a intestinului
	c) *Ocitocina*	Musculatura netedă a uterului. Glandele mamare (după naștere)	Contracția musculaturii netede a uterului și expulzarea fătului. Eliminarea laptelui din glandele mamare în timpul alăptării
	4.— *PARS INTERMEDIAR* sau *LOBUL INTERMEDIAR* Hormonul melanocitostimulator (MSH)	Celulele melanofore	Pigmentarea pielii și răspîndirea dispersă a pigmentului
	5. — *TIROIDA* *Calcitonina* sau tirocalcitonina	Sistemul osos	Metabolismul fosforului și calciului
	6. — *GLANDELE PARATIROIDE*		
	a) *Paratirina* sau parathormonul	Oase, rinichi, tract gastrointestinal	Metabolismul fosforului și calciului
	b) Calcitonina	Sistemul osos	Metabolismul fosforului și calciului
	7. — *PANCREASUL ENDOCRIN*		
	a) *Insulina*	Acțiune generală asupra organismului și metabolismului	Stimularea sintezei proteice, a lipogenezei și metabolizarea glucidelor la nivelul diferitelor țesuturi
	b) *Glucagonul* sau factorul hiperglicemic	Țesutul hepatic Țesutul adipos	Stimulează glicogenoliza și punerea în circulație a lipidelor din țesutul adipos

* După numeroși autori vasopresina și ocitocina sînt elaborate la nivelul hipotalamusului și depozitate în neurohipofiză.

a	b	c	d
	8. — *TIMUSUL* *Timopoietina* sau timina	Celulele limfoide	Stimulează limfocitopoeza şi maturarea componentelor imunologice ale limfocitelor
	9. — *CORPUL GALBEN* *Relaxina*	Acţionează asupra simfizei pubiene	Menţinerea tonusului muscular
	10. — *PLACENTA* a) Gonadotropina	Ovar Testicule	Dezvoltarea foliculilor, a celulelor interstiţiale, ovulaţia, spermatogeneza etc.
	b) *Relaxina*	Simfiza pubiană	Menţinerea tonusului muscular
	11. — *TUB DIGESTIV* a) *Gastrina*	Stomac	Secreţia de acid
	b) *Secretina*	Pancreas	Secreţia de suc pancreatic
	c) *Pancreozimina* sau colecistokinina	Pancreas	Secreţia enzimelor pancreatice ale digestiei
B. — *Hormoni derivaţi de la aminoacizi*	*T. — TIROIDA* Tiroxina şi triiodtironina	Acţiune multiplă şi generală	Metabolismul bazal şi consumul de oxigen de către ţesuturi
	2. — GLANDELE SUPRARENALE (partea medulară). a) Adrenalina	Arteriole, musculatura netedă şi muşchiul cardiac; ţesutul hepatic şi ţesutul muscular Ţesutul adipos	Contracţia musculaturii netede, accelerarea ritmului cardiac şi a pulsului. Glicogenoliza în ficat şi în muşchi. Punerea în circulaţie a lipidelor
	b) Noradrenalina	Arteriole Ţesutul adipos	Vasoconstricţie. Punerea în circulaţie a lipidelor din ţesutul adipos

a	b	c	d
	3. — GLANDA PINEALA Melatonina; 5-hidroxitriptofan	Celulele melanofore și gonadele	Determină agregarea pigmentului și deschiderea la culoare a pielii; funcționarea gonadelor
C. — *Hormoni steroizi*	*1. — TESTICULE* Testosteron	Acțiune generală. Glande sexuale	Dezvoltarea caracterelor sexuale secundare; maturarea și funcționarea glandelor sexuale; reproducerea
	2. — OVARE Estrona, estriolul, estradiol etc.	Acțiune generală Glande sexuale Glanda mamară	Dezvoltarea și menținerea caracterelor sexuale secundare; Maturarea și funcționarea normală și ciclică a glandelor sexuale accesorii Dezvoltarea acinilor mamari
	3. — CORPUL GALBEN Progesteron	Uter Glanda mamară	Prepararea uterului pentru nidarea oului; menținerea sarcinii Dezvoltarea sistemului alveolar al glandei mamare
	4. — PLACENTA a) Estrogeni	Vezi acțiune mai sus	
	b) Progesteron	Vezi acțiune mai sus	
	5. — *GLANDELE SUPRARENALE* (partea corticală) a) Aldosteron	Acțiune generală	Metabolismul apei și electroliților
	b) Corticosteroizi (mineralcorticoizi și glucocorticoizi)	Acțiune multiplă și generală	Metabolismul glucidelor și al electroliților; metabolism lipidic; menținerea homeostaziei

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

TABELUL 13.1 (continuare)

a	*b*	*c*	*d*
	6. — *CELULE SAU ȘI FORMAȚIUNI NEUROSECRETOARE* Hormonii nevertebratelor: ecdizona, crustecdizona		
D. — *Alți hormoni*	1. — *FITOHORMONII* a) Gibberelline		
	b) Kinetine		
	2. — *DIFERITE FORMAȚIUNI NEUROSECRETOARE* a) Hormonii de atracție sexuală		
	b) Hormonul juvenil		
	c) Prostaglandine	Sistem nervos central; tract gastrointestinal țesut adipos; musculatura netedă	Excitabilitate, secreție, metabolism lipidic, tonusul musculaturii netede

integrare a fluxului informațional privind viteza și nivelul transformărilor metabolice din diferite organe și țesuturi se realizează și cu ajutorul sistemului endocrin, care la rîndul lui este influențat de starea fiziologică a hipotalamusului.

Glandele endocrine, în ansamblul lor alcătuiesc *sistemul endocrin*. În componența sistemului endocrin al vertebratelor superioare intră următoarele glande cu secreție internă: *hipofiza*, *epifiza*, *tiroida*, *paratiroidele*, *timusul*, *pancreasul* (partea endocrină, insulară), *glandele suprarenale* și *glandele sexuale* sau *gonadele (testicule* sau *ovare)*. La mamifere un rol hormonal temporar îl îndeplinește și *placenta* * (figura 13.1).

Studiul glandelor endocrine a suscitat un deosebit interes din cauza numeroaselor sale aplicații practice în medicina umană. Cu timpul din biologie și medicină s-a desprins o ramură interdisciplinară — *endocrinologia* — care cronologic poate fi situată în anul 1909 cînd savantul român de renume mondial, C. I. Parhon, împreună cu M. Goldstein publică la Paris un volum despre glandele cu secreție internă, lucrare care reprezintă prima carte de endocrinologie din lume. Cercetător erudit, eminent om de știință și în același timp un mare profesor, medic și cetățean, C. I. Parhon a adus numeroase și valoroase contribuții în problema endocrină a constituției corporale, a rolului glandelor endocrine

* În ultimul timp, DeLuca, Kodicek și alții (1969—1972) consideră rinichii drept glande cu secreție internă, datorită rolului lor în metabolismul vitaminei D_3 (colecalciferol).

în geneza formelor corporale, la elucidarea funcţiilor endocrine în timpul vieţii embrionare şi fetale, la îmbogăţirea cunoştinţelor despre patologia creşterii, la studiul clinic şi experimental al bătrîneţii.

La vertebrate, activitatea glandelor endocrine este controlată de hipofiza anterioară prin intermediul numeroşilor *hormoni-tropi* elaboraţi

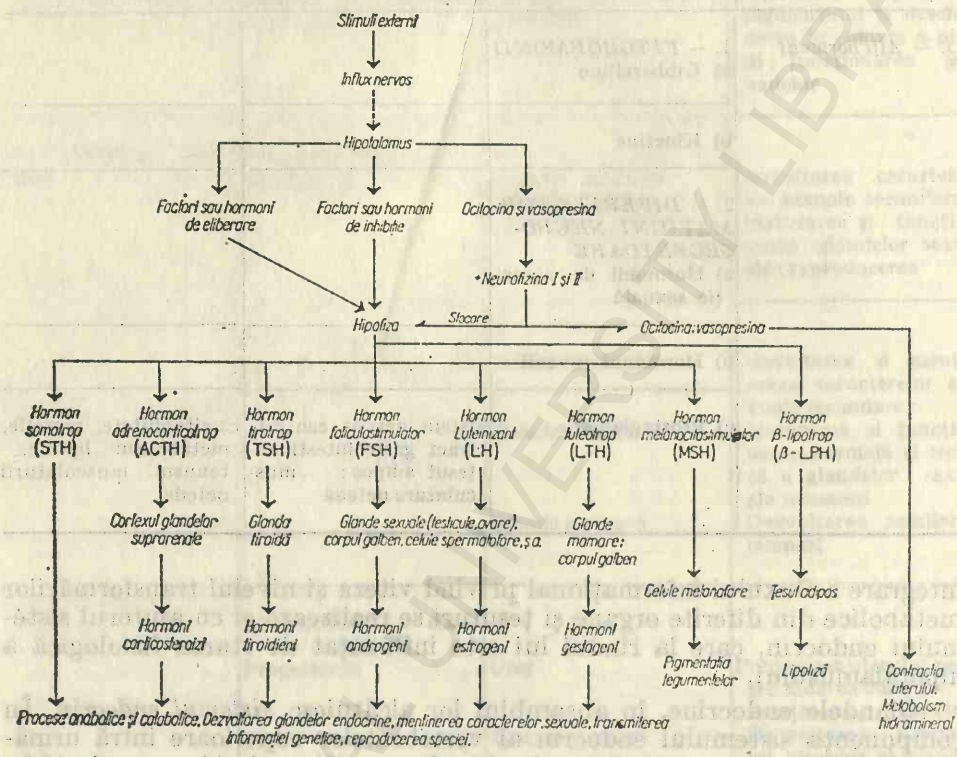


Fig. 13.1. — Reprezentarea schematică a raporturilor dintre glandele cu secreţie internă şi a „reglării lor în cascadă".

de aceasta *(tirotrop, adrenocorticotrop, goanadotropi* etc.). La rîndul ei, hipofiza se află sub controlul hipotalamusului care secretă *„factorii de eliberare"* ce declanşează sinteza *„tropilor"* în hipofiză. Se constituie în felul acesta un fel de *axă hipotalamo-hipofizară alcătuită dintr-o adevărată reţea de reglare în cascadă*: *factorul hipotalamic acţionează asupra adenohipofizei determinînd elaborarea unui hormon, care la rîndul lui stimulează hormonogeneza într-o glandă endocrină terţă.* Hormonul secretat de glanda endocrină terţă care se află sub controlul hipofizei are o acţiune periferică, dar exercită în acelaşi timp şi o *reglare inversă de tip „feedback" (retroinhibiţie negativă) asupra hipotalamusului şi adenohipofizei.* Efectul acţiunii sale este o diminuare a elaborării hormonului hipofizar care stimulează activitatea glandei endocrine respective.

Factorii de reglare secretaţi de către hipotalamus sub influenţa unor stimuli nervoşi sau chimici pătrund în sînge prin *circulaţia portal-hipofizară*, descoperită de Gr. T. Popa şi acţionează asupra hipofizei.

Secreţia de factori de reglare este la rîndul ei dependentă de nivelul hormonilor hipofizari în sînge : o concentraţie mai mică în sînge a unui hormon hipofizar determină o creştere a activităţii secretorii a hipotalamusului, în timp ce existenţa unei concentraţii mai mari în sînge a aceluiaşi hormon duce la reducerea activităţii secretorii de factori de eliberare.

S-a demonstrat, de asemenea, că hormonii neuro-hipofizari — *adiuretina* sau *vasopresina* şi *ocitocina* sînt de fapt elaboraţi de hipotalamus, după care migrînd de-a lungul fibrelor nervoase, conjugate cu proteine cu masă moleculară mică — *neurofizine*, ajung în neurohipofiză unde sînt depozitaţi şi ulterior secretaţi sub influenţa stimulilor nervoşi.

În tabelul 13.2 sînt menţionaţi atît factorii de eliberare secretaţi de hipotalamus cît şi factorii care inhibă secreţia unor hormoni hipofizari. Este de aşteptat ca natura chimică a tuturor acestor factori să fie în curînd clarificată, iar numărul lor să crească. Unii autori propun ca factorii secretaţi de hipotalamus să fie denumiţi *hormoni de eliberare (RH-releasing hormon) secretaţi de hipotalamus* (Schally, Arimura, Kastin, 1974).

În unele cazuri hormonii de natură proteică sau polipeptidică sînt biosintetizaţi de glanda endocrină sub forma unor molecule cu masă moleculară relativ mare, inactive din punct de vedere hormonal, molecule denumite *prohormoni*. Astfel, de exemplu, *insulina*, *hormonul somatotrop*, *parathormonul*, *hormonii tiroidei*, *glucagonul*, *hormonul adrenocorticotrop* sînt elaboraţi sub formă de prohormoni, care sînt hidrolizaţi de către enzimele proteolitice din glanda endocrină respectivă şi numai după aceea secretaţi sub formă de hormoni şi transportaţi ca atare de către sînge la *organele „ţintă"* asupra cărora acţionează. *Procesul de proteoliză este selectiv şi specific pentru fiecare hormon.*

În legătură cu această situaţie particulară a unor hormoni de a exista sub formă de prohormoni se pot avansa diferite ipoteze :

— *forma prohormonală*, care de regulă conţine un fragment polipeptidic în plus şi are deci o masă moleculară mai mare, diferită de a hormonului activ, *măreşte durata activităţii hormonului care este funcţie de gradu de hidroliză enzimatică*;

— *proteoliza selectivă a jucat, probabil, un rol important în cursul evoluţiei* deoarece conţine în ea germenul obţinerii unor molecule de diferite tipuri şi cu activităţi biologice deosebite, formate dintr-o moleculă ancestrală comună (White, Handler, Smith, 1973).

Structura prohormonilor şi mecanismul transformării lor în hormoni sînt expuse pentru fiecare în parte în capitolul corespunzător structurii lor chimice. În cele ce urmează ne vom opri pe scurt asupra unor caracteristici de acţiune ale factorilor sau hormonilor de eliberare încercînd din datele din literatură să conturăm particularităţile lor de acţiune cele mai importante şi care au fost confirmate de numeroşi cercetători.

În primul rînd, hormonii de eliberare (RH-releasing hormon) posedă o mare selectivitate de acţiune, declanşînd eliberarea (sau inhibiţia) din glanda hipofiză în circuitul sanguin a unui singur hormon hipofizar. Mecanismul prin care această *selectivitate de acţiune* este asigurată nu este cla-

Factorii de reglare elaborați de hipotalamusul mamiferelor *

Denumirea și prescurtarea factorului de reglare după nomenclatura internațională	*Hormonul a cărui secreție o controlează*	*Glanda țintă care este influențată în final*	*Observații*
1. *Corticoliberina* sau factorul de eliberare al hormonului adrenocorticotrop (CRF_s)	Hormonul adrenocorticotrop (ACTH)	Glanda suprarenală (partea corticală)	Numărul factorilor de eliberare este încă în discuție
2. *Folliberina* sau factorul de eliberare al hormonului foliculostimulator (FRF) sau (FSH-RF)	Hormonul foliculostimulator (FSH)	Ovar; testicule	
3. *Luliberina* sau factorul de eliberare al hormonului luteinizant (LRF sau LH-RF)	Hormonul luteinizant (LH)	Ovar; testicule	
4. *Gonadoliberina* sau factorul de eliberare al gonadotropinelor (LH/FSH-RF)	Hormonii gonadotropi	Ovarul și testiculele	
5. *Tiroliberina* sau factorul de eliberare al hormonului tirotrop (TRF)	Hormonul tirotrop (TSH)	Tiroida	
6. *Factorii de reglare ai hormonului de creștere*: a) *Somatoliberina* sau factorul de eliberare (GRF sau GH-RF) b) *Somatostatina* sau factorul de inhibiție (GIF)	Hormonul somatotrop (STH)		Sînt afectate toate procesele de creștere și metabolismul glucidic, protidic și lipidic
7. *Factorii de reglare ai hormonului melanocitostimulator* (MSH): a) *Melanoliberina* sau factorul de eliberare (MSH-RF) b) *Melanostatina* sau factorul de inhibiție (MSH-IF)	Hormonul melanocitostimulator (MSH)		Sînt afectate celulele melanofore
8. *Factorii de reglare ai prolactinei*: a) *Prolactoliberina* sau factorul de eliberare (PRF) b) *Prolactostatina* sau factorul de inhibiție (PIF)	Prolactina		

* Hipotalamusul secretă numeroși factori, denumiți factori hipotalamici de eliberare, de natură peptidică și polipeptidică, precum și vasopresina și ocitocina care sînt transportate ulterior în neurohipofiză. Denumirile recomandate de IUPAC și IUB sînt cele scrise cu litere cursive.

rificat, dar s-a constatat că mărirea concentrației ionilor de K^+ în spațiul extracelular este de natură să stimuleze eliberarea hormonului respectiv. Alți ioni, de exemplu, Na^+ și Ca^+, precum și oxigenarea țesuturilor sînt, de asemenea, de natură să provoace o eliberare sporită de hormon, dar numai în prezență de RH.

În al doilea rînd, reacția organismului la introducerea acestor RH *este extrem de rapidă*, numai după cîteva secunde, uneori chiar spontană, la o singură doză de RH administrată intravenos.

În al treilea rînd, majoritatea hormonilor de eliberare (RH) secretați de hipotalamus se caracterizează prin faptul că molecula lor are gruparea carboxil de la extremitatea C-terminală întotdeauna blocată sub formă de amidă. Semnificația acestei situații rămîne neclară. Unii factori sau hormoni de eliberare prezintă la extremitatea N-terminală un rest de acid glutamic, sub formă de *acid pirolidon-L-glutamic*, situație observată și în cazul altor peptide cu acțiune biologică. Prima peptidă caracterizată prin aceste două particularități — prezența la extremitatea N-terminal a piro-Glu și a grupării $-CO-NH_2$ de la extremitatea C-terminală, a fost izolată de Dekker, Stone și Fruton (1949), dintr-o algă marină *Pelvetia fastigiata*.

În sfîrșit, cantitatea maximă de hormon hipofizar eliberată sub influența RH atinge limita maximă într-un interval de timp relativ scurt, aproximativ 10—15 minute după administrarea lui și este urmată de o revenire la valorile normale, care are loc, de regulă, după 1—2 ore.

Încercările de a demonstra *influența hormonilor de eliberare asupra biosintezei proteice*, în special a biosintezei unor proteine specifice, nu au fost încununate de succes, deoarece utilizarea *actinomicinei D*, *puromicinei* și *cicloheximidei* nu a evidențiat blocarea sintezei proteinelor specifice în hipofiză. Se presupune că RH acționează în principal asupra eliberării hormonilor respectivi din hipofiză și realizează transportul acestora din țesutul glandular în sînge, dar nu influențează biosinteza lor.

Hormonii sînt substanțe incapabile să creeze *de novo* reacții biochimice la nivel celular, acțiunea lor rezumîndu-se la accelerarea sau diminuarea mersului unor reacții enzimatice din anumite cicluri metabolice, la modificarea structurii, metabolismului și funcțiilor din celulele-țintă. În acest sens, ei pot fi considerați în raport cu mecanismele celulare, drept „semnale", „mesaje" sau „informații" de cele mai multe ori specifice, destinate unor receptori situați pe celulele diferitelor țesuturi sau ale unor glande endocrine — și capabile să modifice „programul" sau „mersul" reacțiilor intracelulare.

Modalitatea prin care hormonii influențează mersul reacțiilor enzimatice a rămas mult timp neexplicată, pe de o parte, datorită faptului că hormonii au multiple acțiuni, participînd la numeroase reacții și mecanisme de reglare (de la influențarea metabolismului hidro-mineral pînă la biosinteza proteinelor și acizilor nucleici), iar pe de altă parte datorită structurii lor chimice atît de variate, care face imposibilă explicarea acțiunii lor printr-un mecanism unic.

13.2 MECANISMUL DE ACȚIUNE AL HORMONILOR DE NATURĂ PEPTIDICĂ ȘI PROTEICĂ

În 1960 Sutherland și Rall studiind mecanismul de eliberare al glucozei din glicogenul hepatic, sub influența catecolaminelor și a glucagonului observă creșterea concentrației în hepatocit a unui factor termostabil, care ulterior s-a dovedit a fi un acid necunoscut — *acidul adenozin-3′, 5′-monofosforic ciclic* — cAMP (v. capitolul 4), paralel cu o activitate crescută a glicogen fosforilazei hepatice. Aceste experiențe aveau să constituie pentru Sutherland punctul de plecare pentru cercetările ulterioare prin care va demonstra ipoteza că hormonii trebuie considerați ca *mesageri primari* care determină sinteza de cAMP, ce constituie de fapt *mesagerul secund* al acțiunii hormonale. După Sutherland mesagerul primar are ca destinație spațiul (spațiile) extracelular(e), iar mesagerul secund — interiorul celulei, care constituie locul acțiunii

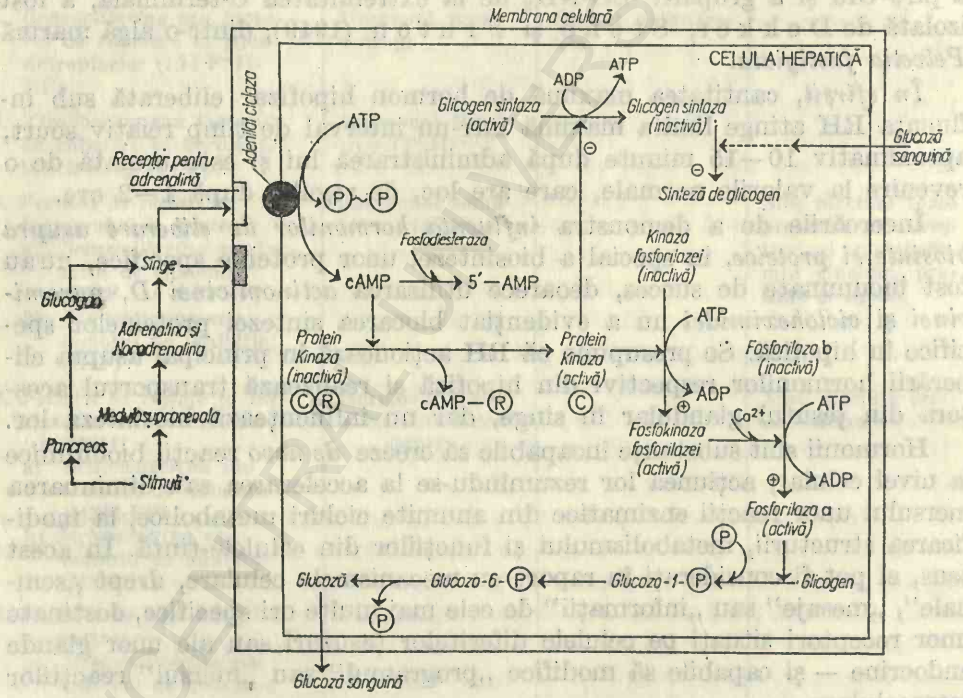


Fig. 13.2. — Schema mecanismului de acțiune al adrenalinei asupra unei celule hepatice și a reglării procesului de glicogenoliză. (+) — efect activator; (—)—efect inhibitor. Glucagonul acționează asupra aceluiași mecanism de reglare, dar legarea lui la receptorul membranar se realizează în alte situsuri receptoare.

lui (Sutherland, Butcher, Robinson, Hardman, 1967; (fig. 13.2). Anii care au urmat descoperirii acidului adenozin-3′,5′-monofosforic ciclic au confirmat răspîndirea acestuia în țesuturile și organele tuturor speciilor. Concentrația cAMP în țesuturile și organele animalelor

este de aproximativ 10^{-6}—10^{-7} M, în timp ce alţi compuşi de natură nucleotidică, de exemplu AMP, ADP, ATP sînt prezenţi în concentraţii ce variază între 10^{-4} şi 10^{-3} M. O altă particularitate a cAMP o constituie faptul că în ţesuturi concentraţia lui variază în funcţie de acţiunea unor hormoni asupra acestor ţesuturi, scăzînd sau crescînd în funcţie de răspunsul fiziologic specific al ţesutului.

Hormonul *prim-mesager* se răspîndeşte în organism omogen şi în acelaşi timp difuz. Mesajul pe care îl conţine şi care trebuie să ajungă la *organele-ţintă* sau la *ţesuturile-ţintă* se transmite în două etape diferite, din care numai prima este specifică în sensul că hormonul trebuie să fie „recunoscut" de către un *receptor hormonal specific* situat pe membrana celulară. Natura chimică a receptorului hormonal specific membranar rămîne în cazul multor hormoni încă necunoscută, dar majoritatea cercetătorilor înclină să presupună că rolul receptorului este îndeplinit de *adenilat ciclaza* — enzimă localizată pe faţa internă a membranelor celulare şi formată din *două subunităţi*: *catalitică* © şi *reglatoare* ®.

Rezultatul recepţionării „primului mesaj" transmis de hormon este o activare a adenilat ciclazei, urmată imediat de cea de a doua fază a transmiterii mesajului, care este „faza de amplificare", concretizată într-o sinteză *de novo* de cAMP: adenilat cilaza în prezenţa Mg^{2+} transformă ATP în cAMP.

Aproximativ în perioada anilor 1967—1970 cAMP a fost recunoscut ca cel de-al doilea mesager în toate celulele şi aproape la toate speciile studiate, în cazul acţiunii următorilor hormoni: hormonul adrenocorticotrop, hormonul tirotrop, glucagonul insulina, ocitocina, vasopresina, hormonul melanocitostimulator, tirocalcitonina, adrenalina, noradrenalina, hormonul luteotrop, parathormonul şi chiar şi pentru factorii de eliberare hipotalamici etc. În acelaşi timp s-a constatat că o serie de compuşi, de exemplu, multe *substanţe farmacodinamice* — ouabaina, imidazolul, histamina, fluorura de sodiu, batracotoxina, xantinele ş.a. — sau *substanţe nehormonale* — acetilcolina, derivaţi ai acizilor graşi superiori nesaturaţi şi altele — pot, de asemenea, modifica concentraţia cAMP din celule, deoarece adenilat ciclaza reacţionează la acţiunea lor (Mansour, Sutherland, Rall, Bueding, 1960).

AMP-3′, 5′-ciclic este la rîndul lui inactivat de către o enzimă — *AMP fosfodiesteraza* — prezentă în citosolul majorităţii celulelor animale, şi necesită ioni de Mg^{+}, cu formare de acid adenozin 5′-monofosforic. AMP fosfodiesteraza este inhibată specific de cafeină şi teofilină, alcaloizi prezenţi în cafea şi ceai.

Acţiunea celui de al doilea mesager este nespecifică în sensul că cAMP acţionează multiplu asupra metabolismului celular şi răspunsul numai depinde de acţi nea hormonului care a indus sinteza. Sutherland şi alţii (1967) afirmă că *„celulele vor face ceea ce le permite echipamentul lor enzimatic să facă"*, cu alte cuvinte vor reacţiona în mod diferit la unul şi acelaşi stimul — cAMP aşa după cum reiese şi din figura 13.2.

Adrenalina, în concentraţii variind între 10^{-} şi 10^{-10} M este l gată la situsurile receptoare de pe suprafaţa celulei hepatice, ceea ce cauzează, probabil, o modificare conformaţională locală care are drept rezultat activarea adenilat ciclazei situată pe suprafaţa internă a membranei celulare. Adenilat ciclaza scindează ATP cu formare de cAMP, iar acesta

se leagă la subunitatea reglatoare a *protein kinazei*, eliberînd subunitatea catalitică a acestei enzime într-o formă activă. Protein kinaza activă catalizează fosforilarea kinazei fosforilazei inactive cu formare de *fosfokinaza fosforilazei* în stare activă. Fosfokinaza fosforilazei, în prezența Ca^{2+} și a ATP catalizează activarea *fosforilazei b* cu formare de *fosforilază a*, activă — enzimă care scindează fosforolitic glicogenul cu formare de *glucozo-1-fosfat*, care trece în glucozo-6-fosfat și apoi în glucoză, eliberată din hepatocit în sînge. Concentrația cAMP intracelular poate ajunge la 10^{-6} M și procesul de hidroliză a glicogenului durează cîteva secunde. Adrenalina inhibă concomitent *glicogen sintaza*, activă prin defosforilarea ei sub acțiunea subunității catalitice a protein kinazei active ©. Cînd concentrația adrenalinei în sînge scade, cAMP este transformat în 5'-AMP, subunitățile protein kinazei se reasociază într-un complex inactiv, fosfokinaza fosforilazei este defosforilată și trece în forma inactivă, iar fosforilaza *a* trece în fosforilază *b*. În acest caz, sistemul glicogenolitic este inhibat, iar glicogen sintaza este reactivată prin fosforilare. Adrenalina stimulează glicogenoliza în mușchii striați și în cord, cu formare de acid lactic și tot ea stimulează și o lipază din țesutul adipos care hidrolizează triacilglicerolii. Într-un mod similar, descris mai sus pentru celula hepatică și adrenalină, acționează și *glucagonul* — hormon hiperglicemiant elaborat de pancreasul endocrin.

Din cele descrise mai sus, reiese că în conformitate cu acest model de acțiune, pătrunderea în celulă a hormonului nu este obligatorie. Totuși, în cazul unor hormoni steroidici, de exemplu, a estradiolului s-a putut demonstra, folosindu-se preparate hormonale radioactive, pătrunderea acestuia în interiorul celulei-țintă (uter, vagin, hipofiză anterioară) unde, probabil, influențează activitatea anumitor gene și, în consecință, procesul sintezei proteinelor și are deci un alt mecanism de influențare a proceselor celulare. Cunoștințele noastre actuale sînt insuficiente pentru a formula un mecanism de acțiune în cazul hormonilor tiroidieni, deși declanșarea sintezei lor în tiroidă se realizează după principiul celui de-al doilea mesager. Tot Sutherland înclină să creadă că în cazul hormonilor steroidici, a insulinei și a hormonilor tiroidieni s-ar putea să vorbim despre „*al treilea mesager*" cu rolul de a dirija activitatea metabolică a celulelor receptoare sau a celulelor țintă. De semnalat, de asemenea și faptul că același autor în 1967 nu exclude posibilitatea ca primul mesager să inducă și formarea altor mesageri secundari, de exemplu *GMP-ciclic* (acidul guanilic ciclic) sau după alți autori a histaminei (V. Yudaev, 1975).

Experimentele ulterioare aveau să arate că acest mecanism este în general corect, dar că pentru diferiți hormoni și organe sau celule-țintă asupra cărora acționează, există unele particularități privind fie formarea complexului hormon-receptor, fie răspunsul țintei la acțiunea hormonului. Celulele suprarenale, de exemplu, conțin un receptor capabil să lege pînă la 70% din hormonul adrenocorticotrop marcat cu ^{125}I; alți hormoni — arginin-vasopresina-^{125}I, hormonul placentar lactogen uman-^{125}I, hormonul foliculostimulator-^{125}I nu sînt legați de celulele suprarenale, după cum nici alte preparate celulare obținute din rinichi, mușchiul cardiac, mușchiul striat și din ficat — nu sînt capabile să lege ^{125}I-ACTH. Roth, Pastan, Lefkowitz, Freyshet și Neville (1971)

au arătat că în celulele suprarenale sînt prezente două feluri de receptori hormonali specifici pentru ACTH : receptori cu o specificitate mare („high order sites") care formează 0,1% din totalul situsurilor de legare a ACTH şi care la concentraţii mici ale ACTH numai jumătate din întreaga lor cantitate se găseşte sub formă legată, şi alţi receptori cu specificitate mică („low order sites") întîlniţi frecvent *in vivo*. Într-o celulă suprarenală, după opinia autorilor citaţi, ar exista 60 de „high order sites" şi 360 000 de „low order sites" şi ambele forme ar fi funcţionale în procesele de activare ale adenilat ciclazei şi de steroidogeneză, dar rolul lor după L e f k o w i t z şi a l ţ i i (1971) este diferit. La concentraţii mici ale ACTH, receptorii „high order sites" se saturează mai repede, dar disociază lent asigurînd o acţiune de mai lungă durată a hormonului, în timp ce „low order sites", *in vitro* se saturează mai lent, disociază mult mai rapid şi asigură un răspuns prompt şi de scurtă durată faţă de o creştere neaşteptat de mare a ACTH în plasmă. Această reacţie diferenţiată a celor două tipuri de receptori introduce o nouă reprezentare despre existenţa în celulă a unor mecanisme şi reacţii care permit acestora un răspuns flexibil adecvat faţă de factorul extern, în cazul acesta faţă de hormon. Dacă la această reprezentare mai adăugăm şi faptul că legarea ACTH de către receptorii hormonali membranei este condiţionată în mare parte de concentraţia calciului în celula suprarenală (la o concentraţie a ionilor de Ca^{2+} de 5 mM — 50% din capacitatea receptorului de a lega hormonul este inhibată, iar la o concentraţie de 10 mM — inhibiţia este totală) tabloul interrelaţiilor hormon-receptor membranar-mediu intern celular se întregeşte şi mecanismul de acţiune al hormonului pare mai complicat.

În cazul acţiunii altor hormoni asupra sistemului membranar al adenilat ciclazei, de exemplu, a glucagonului, Ca^{+} s-a dovedit a acţiona ca un inhibitor; adenilat ciclaza hepatică, din muşchiul cardiac, celulele adipoase, creier şi din glanda parotidă este activată de alţi ioni divalenţi — Mg^{2+}, Mn^{2+}. Această situaţie particulară privind mecanismele de acţiune ale hormonilor şi rolul diferitelor *microelemente*, precum şi posibilitatea asigurării unui răspuns biologic specific nu poate fi explicată decît admiţînd faptul că sistemul adenilat ciclazei este alcătuit din mai multe componente moleculare, inclusiv din lipidele membranare. Chiar în ipoteza originală, formulată de S u t h e r l a n d şi a l ţ i i receptorul hormonal este considerat ca o parte constituentă a adenilat ciclazei.

13.3 MECANISMUL DE ACŢIUNE AL HORMONILOR STEROIZI

Mecanismul de acţiune a hormonilor androgeni. În funcţie de intensitatea răspunsului faţă de *acţiunea hormonilor androgeni*, ţesuturile pot fi împărţite în două mari categorii : ţesuturi-ţintă care reacţionează puternic la tratamentul cu androgeni, de exemplu, organele masculine sexuale secundare (epididimusul, veziculele seminale, prostata, ductul deferent) şi parţial sistemul nervos central (creierul, în special hipotalamusul) şi ţesuturile-ţintă care reacţionează puţin sau foarte slab, de exem-

plu, ţesutul osos, rinichiul, glandele salivare, muşchii, pielea etc. În ţesuturile din prima categorie s-a demonstrat experimental că enzima *NADPH : 5-6-cetosteroid reductaza* necesară pentru metabolizarea androgenilor este prezentă într-o concentraţie mai mare decît în ţesuturile-ţintă care au un răspuns slab la androgeni.

La nivelul prostatei şi veziculelor seminale la şobolan *efectul biochimic al administrării androgenilor* se caracterizează printr-o *accelerare a sintezei proteice*, în creşterea raportului proteine/DNA şi în activarea unor enzime (Butler şi Schade, 1958; Wagner şi Hughes, 1974), procese care sînt dublate de o *sinteză crescută de RNA mesager* (Vicks şi Kenney, 1964) şi de o *activitate mai mare a RNA-polimerazei*. Vicks şi Kenney (1964) semnalează faptul că RNA sintetizat sub influenţa administrării de androgen este de fapt un amestec de diferite specii de RNA şi nu numai *m*RNA, ceea ce nu este în deplină concordanţă cu schema elaborată de Karlson (1963) privind acţiunea hormonilor steroizi asupra aparatului genetic. Liao, Barton şi Lin (1966) folosind *actinomicina D* au arătat că injectarea de androgeni are drept efect atît sinteza de *m*RNA cît şi o sinteză de *r*RNA. În privinţa influenţei androgenilor asupra conţinutului de DNA şi a activităţii DNA-polimerazei în organele-ţintă, datele din literatură sînt controversate cu privire la timpul de declanşare a efectului şi la durata lui.

Karlson (1963) postulează că modificările ce survin în RNA nuclear sînt consecinţa faptului că *un număr mai mare de gene loci sînt accesibile transcripţiei în organele-ţintă* de la animalele tratate cu androgeni sau estrogeni. Această ipoteză a fost confirmată în cazul estradiolului administrat animalelor castrate şi al cortizonului injectat în ficatul animalelor adrenalectomizate (Barker şi Warren, 1966; Dahmus şi Bonner, 1965).

Bruchovsky şi Wilson (1968, *a*, *b*) utilizînd testosteron marcat cu tritiu şi procedînd la separarea fracţionată a conţinutului celular al organelor-ţintă au ajuns la concluzia că citoplasma conţine o cantitate mare de *androstandiol* şi *dihidrotestosteron*, precum şi cantităţi mici de *testosteron*, în timp ce nucleii celulelor din prostată conţin numai *dihidrotestosteron* şi *testosteron*. Concluziile acestor experienţe au fost confirmate mai tîrziu de Sar, Liao şi Stumpf (1970), Sar şi Stumpf (1973) care prin metoda autohistoradiografiei au arătat că la şobolanii masculi castraţi, testosteronul radioactiv se concentrează în nucleii celulelor epiteliale ale prostatei şi ale vezicii seminale.

În 1968, Baulieu, Lasnitzki şi Robel au semnalat că în prostată dihidrotestosteronul se acumulează în cantităţi mari, creînd impresia că este un androgen mult mai activ decît testosteronul. Bruchovsky (1971) folosind diferiţi androgeni naturali şi animale de experienţă castrate şi hepatoectomizate a demonstrat experimental posibilitatea transformării cu prioritate de către citoplasma şi nucleii celulelor din prostată a androgenilor — testosteron, androsteron, androstendiona, androstendiol, androstandiona şi alţii — în dehidrotestosteron.

O altă dovadă a faptului că dehidrotestosteronul este un metabolit intermediar activ au constituit-o studiile asupra receptorilor androgenici din nucleul şi citoplasma organelor sexuale secundare.

Receptorul citoplasmatic din organele-țintă a androgenilor la masculi s-a dovedit a fi o proteină stabilă la tratamentul cu *deoxiribonuclează* și *ribonuclează*, dar inactivată de *tripsină* și de *pronază* și extrem de sensibilă față de agentul termic. În schimb complexul receptor-hormon este mai rezistent la încălzire și față de acțiunea agenților proteolitici, inclusiv a proteazelor. *Receptorul androgenic din citoplasmă este o proteină cu proprietăți acide* (Fang, Anderson, Liao, 1969; Mainwaring, 1969; Mainwaring, Irving, 1970) *care manifestă o înaltă specificitate pentru dehidrotestosteron*, în timp ce alți compuși steroidici — progesteronul, 3α- și 3β-androstandiolul, cortizolul și estradiol-17β nu sînt legați de receptor în cantități decelabile. Se pare că această proteină receptor este asociată cu fracția ribozomală și are o masă moleculară de 200 000 (Mainwaring, Irving, 1970).

Din nucleii celulelor izolate din organele-țintă ale androgenilor a fost izolat un receptor pentru dehidrotestosteron care este solubil numai în soluții saline concentrate, spre deosebire de receptorul citoplasmatic solubil în soluții ionice diluate sau chiar în apă. Ca și acesta, *receptorul nuclear este termolabil*, distrus sub acțiunea proteazelor — tripsina, pronaza — indiferent față de acțiunea nucleazelor și *este o proteină cu caracter acid.* Mainwaring (1969) a determinat masa moleculară a acestui receptor și a găsit-o, folosind o coloană de agaroză, variind între 100 000 și 120 000. Receptorul nuclear este *legat de fracția care la ultracentrifugare sedimentează la 3 S.*

În fracția proteinelor nucleare extrase din celula renală cu TRIS-$CaCl_2$ 3 mM a fost identificată o *proteină cromozomială nehistonică*, cu constanta de sedimentare 4 *S*, termolabilă și ușor stabilizată de soluții de glicerol 20%, *care constituie un sistem specific pentru legarea aldosteronului și hormonilor mineralocorticoizi.* Gradul de afinitate al diferiților hormoni față de situsul de legare descrește de la α-aldosteron >9-α-fluorocortizol >cortizol > >17-α-estradiol ≃ progesteron ≃ 17-α-izoaldosteron. Fiecare nucleu al celulei renale poate lega aproximativ 600 molecule de aldosteron ceea ce constituie o valoare comparativ egală cu capacitatea de legare a altor hormoni steroizi de către nucleii celulelor din uterul de șobolan și de bovine (Swaneck, Chu, Edelman, 1970).

Mecanismul de acțiune al hormonilor estrogeni. Spre deosebire de ceilalți hormoni care acționează după schema lui Sutherland, hormonii steroizi pătrund în celulă și acționează la nivelul genetic al acesteia în trei etape diferite în funcție de natura chimică a hormonului. Unii hormoni steroizi pătrund în celulă nemodificați, de exemplu, estradiolul, în timp ce alții—testosteronul, progesteronul etc. sînt metabolizați anterior pătrunderii lor în celulă; odată ajunși în celulă *hormonii steroizi interacționează cu receptorii* formînd un complex care reprezintă primul răspuns al celulei la acțiunea hormonului. Faza următoare rezidă în declanșarea unor modificări și este o „amplificare" a răspunsului inițial al celulei.

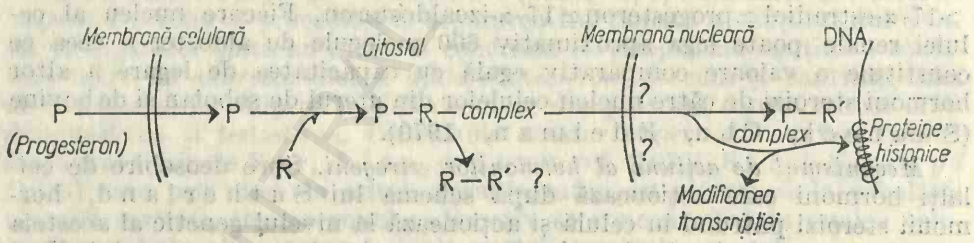
Hormonii estrogeni acționează în celulă asupra aparatului genetic. În acest sens s-au acumulat următoarele dovezi experimentale:

— injectarea de hormoni estrogeni puilor de găină imaturi determină diferențierea a trei tipuri de celule epiteliale din populația celulelor nediferențiate ale oviductului;

— estradiolul stimulează sinteza unor proteine structurale ale uterului, precum și sinteza de enzime, în timp ce progesteronul determină în oviductul de pui sinteza unei proteine specifice — *avidina*, însoțită de o sinteză accentuată de RNA.

În scopul precizării etapelor sintezei proteice asupra cărora acționează hormonii estrogeni s-au utilizat uterul de șobolan și de cobai și oviductul de pui de găină. Means și Hamilton în experiențe cu izotopi radioactivi, au observat după două minute de la administrarea de estrogeni șobolanilor adulți ovarectomizați o creștere de 40% a RNA marcat față de lotul martor normal; paralel în experiențe *in vitro* efectuate pe nucleii izolați s-a arătat că estradiolul determină o creștere accentuată a RNA-polimerazei Mg^{2+} dependentă din nucleoli și nucleoplasmă. Plecînd de la aceste dovezi experimentale se presupune că *estrogenii acționează la nivelul procesului de transcripție a informației genetice.* Unii autori subliniază și posibilitatea estrogenilor de a influența și procesul biosintezei proteinelor, mediind transportul RNA în citoplasmă, formarea polizomilor din ribozomii preexistenți independent și stimularea incorporării aminoacizilor în proteinele nou sintetizate.

Localizarea intracelulară a complexului progesteron-receptor rămîne necunoscută deoarece hormonul se poate lega fie de proteinele eucromatinei sau heterocromatinei, fie chiar de cromatina asociată cu membrana nucleară. Cert este însă faptul că *pătrunderea acestui complex în nucleu modifică procesul de transcripție printr-un mecanism încă nelămurit, în cursul căruia, probabil, proteinele nehistonice acceptoare recunosc receptorul hormonal citoplasmatic.* Există și posibilitatea ca însăși aceste proteine să modifice procesul transcripției genetice. Modul de acțiune al progesteronului în celulele-țintă din oviduct, după mecanismul propus de Stein, Spelsberg și Kleirsmith (1974) poate fi ilustrat schematic astfel:



Datele experimentale privind acumularea selectivă a hormonilor steroizi în anumite țesuturi și organe (denumite țesuturi și organe competente, Hesin, 1972) sînt de origine relativ recentă. Estrogenii, de exemplu, *in vivo*, se acumulează în uter, glandele mamare, cortexul glandelor suprarenale, adenohipofiză și se localizează cu preponderență în nucleul celulelor și pot fi identificați în supernatantul omogenatelor tisulare (Toft, Gorski, 1966; Galscock, Hockstra, 1959; Stumpf, 1958).

În serul șobolanilor imberbi, de ambele sexe și în vîrstă de 5—21 zile, există o componentă cu o mare afinitate pentru estradiol și estronă, care diminuează cantitativ, treptat și dispare după cea de a 28-a zi. Această componentă de natură proteică s-a dovedit a fi conținută în frac-

ţia serică albuminică şi activitatea ei scade mult la 70°C. Serul fetal fixează într-un grad neînsemnat şi corticosteronul, progesteronul şi dihidrotestosteronul, iar după naştere în serul animalelor se constată dispariţia gradată a capacităţii de a lega estrogenii însoţită de o creştere paralelă, treptată a afinităţii serului pentru androgeni. Cercetările ulterioare efectuate pe şobolani în vîrstă de cinci zile aveau să arate că legarea estrogenilor se face la nivelul unei α_1-fetoproteine, situată în regiunea α_1-postalbuminică, pe electroforegramele serului animal (Nunez şi colab., 1971 *a*, *b*, *c*); Gusev şi Yazova (1970) confirmă existenţa fracţiei α_1-fetoproteice în serul animal şi uman prin metoda electroforezei în gel de poliacrilamidă.

Primele dovezi experimentale privind mecanismul de acţiune al hormonilor estrogeni au fost aduse de Toft şi Gorski (1966) care au izolat din uterul de şobolan o componentă macromoleculară cu proprietăţi de receptor specific pentru estrogeni şi cu capacitatea de a forma un complex estradiol-receptor cu o constantă de sedimentară de 9,5 *S*. Hormonul este eliberat din acest complex numai în prezenţa enzimelor proteolitice, ceea ce indică natura proteică a componentei. Ulterior s-a demonstrat că aceasta are o masă moleculară de aproximativ 200 000. În plasma celulelor din uterul de viţel este prezentă o componentă cu constanta de sedimentare de 4 *S*, cu o masă moleculară de 75 000 care, de asemenea, formează complexe cu estrogenii şi este stabilizată de ionii Ca^{2+}. Celulele ţintă estrogen-receptoare posedă o mare afinitate pentru estrogeni, care este distrusă numai de reactivii ce blochează grupările SH. Jensen, Hurst, Sombre şi Jungblut (1967) presupun că grupările SH ale receptorului hormonal joacă un rol important în formarea complexului receptor-hormon, influenţînd conformaţia receptorului. Jensen şi alţii (1968) vor demonstra că între receptorul hormonal citoplasmatic şi receptorul nuclear există o relaţie funcţională directă: estradiolul marcat, administrat în doze fiziologice femelelor de şobolan ovarectomizate, este legat de receptorul citoplasmatic 8 *S* formînd un complex receptor-hormon care scade treptat şi constant în decursul primelor patru ore şi începe să crească numai după această perioadă. Constanta de disociere a complexului estrogen-receptor este cuprinsă între 10^{-9} şi 10^{-12} M. Această capacitate a receptorului din citosol de a lega estrogenii este anulată dacă animalelor li se administrează în prealabil *cicloheximidă* sau dacă *in vitro* structura nativă a receptorului este distrusă prin încălzire la 45°C. În absenţa acestui receptor din citosol componenta proteică din nuclei, care are constanta de sedimentare 4—5 *S*, nu este capabilă să formeze complexe ceea ce indică indirect rolul receptorului citoplasmatic în mecanismul de acţiune al hormonilor estrogeni.

Receptorii fracţiei citoplasmatice a celulelor din uter care leagă estradiolul pot fi sintetizaţi şi în absenţa unei sinteze de estradiol de către ovar (de exemplu, în cazul de ovarectomie), iar administrarea de estradiol animalelor ovarectomizate este urmată de o creştere a numărului receptorilor de legare la nivelul nucleului în timp ce în fracţia citoplasmatică numărul lor este în declin (Szabo şi Endröczi, 1974).

Jensen şi De Sombre (1972) incubînd celulele din uterul femelelor de şobolan imatur la diferite temperaturi în prezenţa estrogenilor marcaţi ajung la concluzia că formarea complexului 5 *S* hormon-

receptor are loc în două faze distincte : o asociere spontană a hormonului cu receptorul proteic 8 *S* care este urmată de o transformare conformaţională a acestuia, dependentă de temperatură, în complexe de forma 4 S şi 5 S (fig. 13.3). În sprijinul unui asemenea mecanism sînt şi datele comunicate de Yamamoto şi Alberts (1972, 1974) care au stabilit

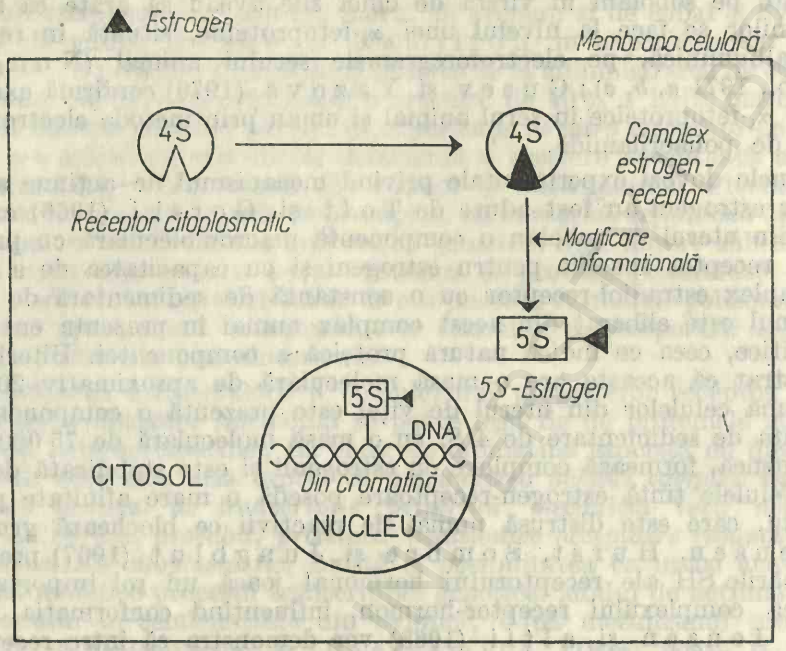


Fig. 13.3. — Schema mecanismului de acţiune a estrogenului asupra unei celule uterine (modificată după DeSombre şi Jensen, 1972).

că masele moleculare ale complexelor proteine-hormoni sînt de 60 000—104 000, ceea ce le-a permis acestor autori să emită ipoteza că receptorul hormonal nuclear 5 *S* reprezintă de fapt componenta 4 *S* de care se leagă o componentă de natură proteică, un fel de subunitate desemnată prin *X*. Numai după această operaţie de formare a complexului 5 *S* apare posibilitatea unei interacţiuni (Eltzina, 1975).

Nucleii celulelor din uterul de viţel pot lega necovalent mari cantităţi de estrogeni, pentru fiecare nucleu revenind aproximativ 2 000—2 500 molecule de estrogen. Dintre proteinele cromozomiale numai fracţiile histonice F_2 şi F_3 leagă complexul hormon-receptor. Spelberg, Steggles, Chytil şi O'Malley (1971, 1972) au arătat că proteinele cu caracter acid ale cromatinei nucleare sînt capabile să lege complexul progesteron-receptor. În citosol se găsesc sub forma a două proteine receptor, cu constante de sedimentare diferite 5 *S* şi 8 *S*, două fracţii proteice acide ; dacă proteina receptor este precipitată în prezenţa unei soluţii de KCl 0,3 M atunci constanta ei de sedimentare este de 3,8 *S* (O'Malley, Toft, Sherman, 1971), în timp ce complexul progesteron-receptor izolat din nucleu are o constantă de sedimentare de 4 *S*. Din experienţele efectuate la 0°C şi 37°C cu progesteron marcat şi cu

fracţii ale citosolului s-a ajuns la concluzia că transportul proteinei receptoare din citos l în nucleu şi concentrarea progestero ului în acesta este un proces dependent de temperatură şi însoţit de declinul concentraţiei proteinei receptoare citoplasmatice. Incubînd progesteronul în prezenţa nucleilor şi citosolului obţinute din alte organe-ţintă (plămîni şi ficat), O'Malley şi alţii (1971) ajung la concluzia că proteina receptoare a progesteronului este prezentă numai în citosol deoarece fracţia 4 *S* nu poate fi obţinută din nucleii celulelor de ficat şi plămîn. O'Malley, Spelsberg, Schrader, Chytil şi Steggles (1972) şi Spelsberg şi alţii (1972) ajung la concluzia că histonele nucleare ale celulelor ţintă în care se acumulează progesteronul nu îndepline c un rol activ şi în consecinţă rolul determinat îl au proteinele acide ale cromatinei nucleare. Tot la acest nivel se controlează, probabil şi procesul de transcripţie printr-un mecanism necunoscut în cursul căruia subfracţiile proteinelor acide care îndeplinesc rolul de receptor hormonal influenţează histonele şi induc, probabil, modificări conformaţionale în structura celor legate de DNA, ceea ce schimbă mecanismul transcripţiei genetice. În sprijinul unei asemenea ipoteze pledează datele comunicate de Libly (1972) care a arătat că acetilarea fracţiilor histonice bogate în arginină este indusă pe cale hormonală. Hamilton, Widnell şi Tata (1968) au remarcat că în uterul şobolanilor ovarectomizaţi sub influenţa estrogenilor este declanşată la un interval scurt de 15 minute sinteza de RNA nuclear, proces care poate fi anihilat dacă se administrează *actinomicină D*. Rezultate similare au fost raportate de numeroşi alţi cercetători, dar mecanismul de acţiune al hormonului rămîne necunoscut.

Într-un articol de sinteză, Eltzina (1975) analizînd datele din literatură ajunge la concluzia că receptorul hormonilor steroizi este o proteină alosterică ce interacţionează cu cromatina nucleară modificînd procesul transcripţiei şi activînd un set determinat de gene care stimulează sinteza proteinelor şi a RNA. Proteinele-receptor sînt substanţe specifice pentru organele-ţintă, pe care autoarea le denumeşte după Hesin (1972) *organe-competente* şi ele trec din forma inactivă într-o formă activă sub influenţa unei substanţe inductor de natură hormonală.

Receptorul hormonilor steroizi poate fi separat în două forme moleculare distincte în cantităţi echimoleculare cu aceeaşi capacitate de legare a hormonului şi mobilitate electroforetică, însă diferite ca stabilitate. Numai una din aceste două subunităţi, denumită *fracţia B* care a fost purificată de 3 000 ori este subunitatea specifică a receptorului nativ, responsabilă pentru legarea specifică a hormonului la situsurile acceptoare ale cromatinei celulelor-ţintă.

14

METABOLISMUL GLUCIDELOR

Studiul *metabolismului glucidelor include*, pe de o parte, *aspectele legate de biosinteza acestora în organismele vegetale şi animale*, iar pe de altă parte, *etapele degradării lor*. Catabolismul glucidelor se referă atît la asimilaţia glucidelor introduse în organism cît şi la degradarea lor, la nivelul celulelor, însoţită de eliberare de energie şi de stocarea acesteia în vederea satisfacerii necesităţilor energetice ale celulei şi ale organismului.

Din aceste considerente metabolismul glucidelor va fi tratat după cum urmează: *procese anabolice (chemiosinteza şi fotosinteza: biogeneza oligo- şi polizaharidelor vegetale; glicogenoneogeneza)* şi *procese catabolice (digestia şi absorbţia zaharurilor; degradarea anaerobă, fermentaţia, calea pentozofosfaţilor, calea* Entner-Doudoroff *şi calea acidului glucuronic)*.

14.1 PROCESE ANABOLICE

Cele trei elemente (C, H şi O) necesare sintezei zaharurilor pe cale chimică sau în procesul fotosintezei sînt prezente în dioxidul de carbon şi în apă, compuşi care se găsesc în cantităţi practic nelimitate pe suprafaţa şi în atmosfera planetei noastre. Reacţia globală care are loc în cursul proceselor de chemio- şi fotosinteză şi care are ca rezultat formarea glucozei şi degajarea oxigenului este:

$$6\ CO_2 + 6\ H_2O + 686\ kcal \longrightarrow C_6H_{12}O_6 + 6\ O_2$$

reacţie endergonică care necesită un considerabil consum de energie. Organismele care realizează această sinteză se numesc *autotrofe* (plantele superioare, microorganismele care conţin bacterioclorofilă, microorganis-

mele chemiosintetizante), iar cele care nu o pot efectua se numesc *heterotrofe* (animalele, majoritatea bacteriilor, ciupercile, plantele parazite).

Organismele autotrofe care folosesc ca sursă de energie pentru biosinteza zaharurilor energia rezultată dintr-alte reacţii chimice exergonice se numesc *chemiosintetizante*, iar cele care utilizează energia radiaţiilor luminoase — *fotosintetizante*.

14.1.1 Chemiosinteza

Acest proces este realizat de o serie de microorganisme denumite şi chemoautotrofe, capabile să asimileze dioxidul de carbon şi să sintetizeze din el substanţe organice folosind energia rezultată prin oxidarea unor compuşi anorganici. Microorganisme chemoautotrofe, în funcţie de substanţele minerale oxidate, se clasifică în: *microorganisme nitrifiante, sulfuroase, feruginoase* şi *hidrogenobacterii*. Astfel, amoniacul rezultat din degradarea substanţelor organice este oxidat de bacteriile nitrifiante din genul *Nitrosomonas*, după cum urmează:

$$2\ NH_3 + 3\ O_2 \longrightarrow 2\ HNO_2 + 2\ H_2O\ (\Delta F = -148\ kcal)$$

Energia degajată din această reacţie exergonică este folosită în sinteza compuşilor organici.

O altă categorie de bacterii nitrifiante din genul *Nitrosobacter* continuă acţiunea de oxidare, trecînd acidul azotos, respectiv azotiţii în acid azotic (azotaţi), în cursul unei reacţii, de asemenea, exoterme:

$$2\ HNO_2 + O_2 \longrightarrow 2\ HNO_3\ (\Delta F = -43{,}2\ kcal)$$

Rezultatul activităţii bacteriilor nitrifiante este creşterea concentraţiei azotaţilor, din sol şi din ape. Acest proces reprezintă un factor important al fertilizării solului.

Sulfobacteriile din apele bogate în H_2S, provenit din procesele de putrefacţie, pot realiza chemiosinteza pe baza reacţiei de oxidare a hidrogenului sulfurat:

$$2\ H_2S + O_2 \longrightarrow 2\ H_2O + 2\ S\ (\Delta F = -63\ kcal)$$

Sulful pus în libertate se acumulează în celule sub formă de granule. Sulfobacteriile realizează în continuare reacţia lui de oxidare cu formare de acid sulfuric:

$$2\ S + 3\ O_2 + 2\ H_2O \longrightarrow 2\ H_2SO_4\ (\Delta F = -284\ kcal)$$

Energia totală eliberată de sulfobacterii în cursul celor două reacţii este de aproximativ 159 kcal pentru fiecare moleculă de hidrogen sulfurat oxidată. Sulfobacteriile au o mare răspîndire în apele mărilor închise, de tipul Mării Negre, care la o adîncime de peste 200 m sînt bogate în H_2S. În mediile bogate în hidrogen sulfurat cresc şi bacteriile purpurii care conţin pigmenţii: roşu — *bacterioeritrina* şi verde — *bacterioclorina*, cu ajutorul cărora îndeplinesc, la întuneric, chemiosinteza, plecînd de la hidrogen sulfurat. În condiţii de lumină, bacteriile purpurii pot îndeplini, concomitent, şi chemiosinteza şi fotosinteza.

Hidrogenbacteriile, răspîndite în sol, pot realiza chemiosinteza pe baza reacţiei de oxidare a hidrogenului, rezultat în urma unor degradări anaerobe, a substanţelor organice:

$$2\ H_2 + O_2 \longrightarrow 2\ H_2O\ (\Delta F = -113{,}4\ \text{kcal})$$

Bacteriile feruginoase sau siderobacteriile folosesc în cursul activităţii lor fiziologice energia rezultată din reacţiile de oxidare a sărurilor feroase în scopul asimilării dioxidului de carbon:

$$4\ FeCO_3 + O_2 + 6\ H_2O \longrightarrow 4\ Fe(OH)_3 + 4\ CO_2\ (\Delta F = -81\ \text{kcal})$$

Aceste bacterii, răspîndite în apele dulci, marine şi oceanice, sînt cauza formării unor zăcăminte de minereuri de fier.

14.1.2 Fotosinteza

Procesul prin care se realizează asimilaţia dioxidului de carbon de către plantele verzi, sub influenţa luminii şi în prezenţa pigmenţilor fotosensibili, dintre care *clorofila* este cel mai cunoscut şi cel mai important, se numeşte *fotosinteză* sau *asimilaţie clorofiliană.* O variantă a fotosintezei, incomparabil mai puţin însemnată, realizată de unele microorganisme care conţin bacterioclorofilă, este cunoscută sub denumirea de *asimilaţie bacterioclorofiliană.*

În procesul fotosintezei, printre *produşii primari se numără atît componente glucidice cît şi aminoacizi şi compuşi întîlniţi în structura lipidelor.* În cele ce urmează va fi prezentată numai problema biosintezei glucidelor în cursului procesului de fotosinteză.

Asimilaţia clorofiliană reprezintă principala cale de sinteză a materiei organice şi unica sursă de oxigen liber de pe planeta noastră. Anual, în cursul procesului de fotosinteză, se formează aproximativ 270×10^9 tone glucoză şi se eliberează 288×10^9 tone oxigen, consumîndu-se circa 396×10^9 tone de dioxid de carbon. În acest fel, procesul de fotosinteză furnizează, pe de o parte, întreaga cantitate de hrană şi de oxigen necesare organismelor animale, iar pe de altă parte consumă dioxidul de carbon din atmosferă a cărui acumulare peste o anumită limită pericliteză viaţa.

Fotosinteza este realizată numai de plantele verzi, cu ajutorul pigmenţilor fotosintetizanţi, reprezentaţi de clorofile şi pigmenţii „accesorii" sau „auxiliari" — toţi localizaţi în cloroplaste. Încercările de a realiza fotosinteza cu ajutorul clorofilei pure au eşuat. *Experienţele in vitro efectuate cu cloroplaste izolate din celule au subliniat încă o dată importanţa pigmenţilor „accesorii" şi a sistemelor enzimatice prezente în cloroplaste.*

Studiile de microscopie electronică au arătat existenţa în interiorul cloroplastelor a unor formaţiuni membranare caracteristice, numite *grana,* cu o structură lamelară, care reprezintă *stroma* (fig. 14.1). Fiecare cloroplast conţine, de regulă, 10—100 grane de o formă aproximativ cilindrică, cu un diametru de 4 000—6 000 Å şi o lungime de 5 000—8 000 Å.

Compoziţia cloroplastelor, raportată la substanţa uscată, constă din aproximativ *50% proteine, 35% lipide* şi *7% pigmenţi (în principal, clo-*

rofile, carotenoizi şi ficobiline). Pe lîngă aceste componente principale a fost evidenţiată şi prezenţa *citocromilor f* şi b_{563}, a *nafto-* şi *benzo- chinonelor (vitamina K* şi *plastochinone), flavinelor* şi *nucleotidelor piridinice.*

Principalul pigment asimilator, clorofila, este legat nestoichiometric de o proteină cu care formează un complex, numit *cloroplastină* — în

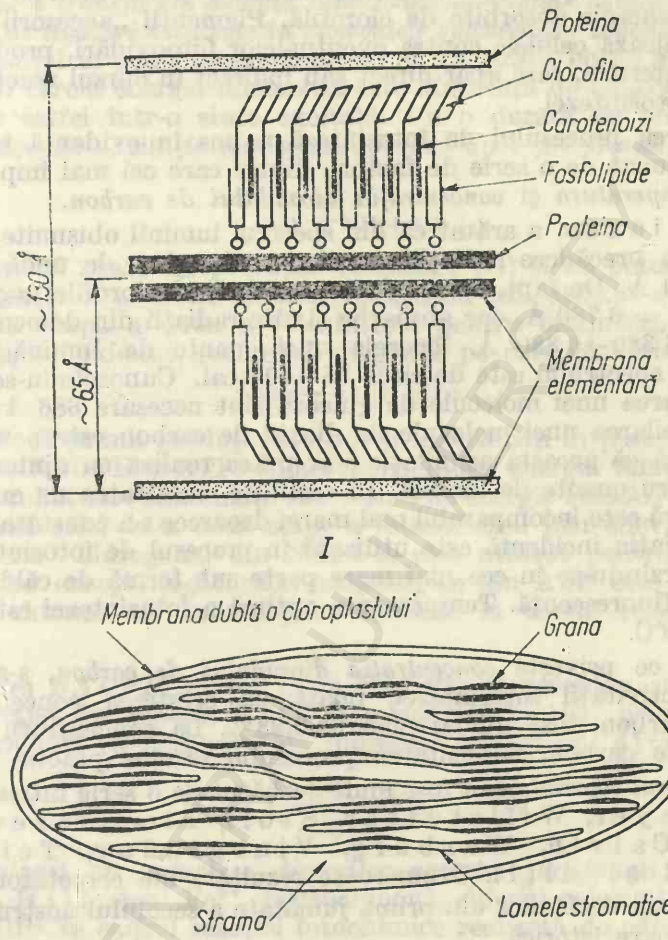


Fig. 14.1. — Ultrastructura unei lamele stromatice (I) şi a unui cloroplast (II).

care sînt prezente şi lipide. Ficobilinele sînt, de asemenea, legate de proteine formînd complecşi numiţi *ficoeritrine.*

Dintre toate componentele cloroplastelor, *clorofilele joacă rolul esenţial în procesul fotosintezei. Clorofila a este singurul pigment comun tuturor plantelor verzi, capabil să transfere direct energia sa reacţiei fotosintetizante.* Rolul clorofilei *b* ca şi al altor pigmenţi accesorii, ai fotosintezei, nu a fost încă suficient elucidat. Se cunoaşte că, atît clorofila *b* cît şi pigmenţii

carotenoizi care însoțesc întotdeauna clorofila *a* au rolul important de a mări *domeniul spectral utilizabil în fotosinteză*. Dacă cloroplastele sînt tratate cu o radiație de o anumită lungime de undă, absorbită doar de clorofila *b* sau de carotenoizi, aceștia din urmă emit la rîndul lor o radiație care este absorbită de clorofila *a*, realizîndu-se astfel un transfer de energie radiantă spre sistemul fotosintetizant și mărindu-se numărul de cuante de energie absorbite de clorofilă. Pigmenții „accesorii" și carotenoizii protejează celulele contra eventualelor fotooxidări, produse de unii oxidanți puternici, care apar direct sau indirect în cursul reacțiilor secundare ale fotosintezei.

Cercetarea procesului de fotosinteză a pus în evidență faptul că el este condiționat de o serie de factori, dintre care cei mai importanți sînt *lumina*, *temperatura* și *concentrația dioxidului de carbon*.

Timiriazev a arătat că din spectrul luminii obișnuite, clorofila *a* absoarbe cu precădere radiațiile roșii cu o lungime de undă de aproximativ 7 000 Å. De fapt, spectrul de absorbție al clorofilei *a* prezintă un maxim la $\lambda = 6\,780$ Å, dar absoarbe și alte radiații din domeniul cuprins între $\lambda = 6\,380-6\,880$ Å. Energia unei cuante de lumină din aceste domenii ale spectrului este de circa 35—40 kcal. Cunoscîndu-se că pentru fotosintetizarea unei molecule de glucoză sînt necesare 686 kcal, și deci pentru asimilarea unei molecule de dioxid de carbon este nevoie de 114 kcal, rezultă că această asimilație s-ar putea realiza cu ajutorul a aproximativ patru cuante de lumină. În realitate, cantitatea de energie radiantă necesară este incomparabil mai mare, deoarece s-a constatat că numai 1% din radiația incidentă este utilizată în procesul de fotosinteză, restul energiei pierzîndu-se în cea mai mare parte sub formă de căldură sau de radiație de fluorescență. Temperatura optimă a fotosintezei este cuprinsă între 30—40°C.

În ceea ce privește *concentrația dioxidului de carbon*, s-a observat creșterea activității fotosintezei, odată cu creșterea concentrației de dioxid de carbon, însă numai pînă la 0,28%. La concentrații mai mari de dioxid de carbon, intensitatea procesului rămîne practic constantă.

Mecanismul fotosintezei a fost mult dezbătut de o serie întreagă de cercetători: Bayer, Willstätter, Stoll, Timiriazev, Bach, Liebig, Calvin, Warburg, Vinogradov, Teis, Hill, van Niel și alții. Numeroase rezultate ale cercetătorilor întreprinse în cursul deceniilor din prima jumătate a secolului nostru au astăzi numai o valoare istorică.

O contribuție esențială la cunoașterea mecanismului fotosintezei, îndeosebi în privința produșilor intermediari de reacție au adus-o Calvin și colab. (1947—1956), care, în experiențele realizate pe alga verde *Chlorella*, folosind $^{14}CO_2$ au identificat produșii intermediari și au elucidat, parțial, unele aspecte ale fotosintezei. Cercetările recente interpretează fotosinteza ca pe un proces oxidoreducător, care are loc în două faze: *(a)* — *„reacția fotochimică"*, care necesită energie luminoasă și în cursul căreia apa este scindată în oxigen și hidrogen, și *(b)* — *„reacția la întuneric"*, care reprezintă *etapa reductivă* a dioxidului de carbon. În această etapă, dioxidul de carbon este redus cu ajutorul hidrogenului

obținut anterior. Rezultatul acestor două reacții este biosinteza glucozei, de la care prin procese ulterioare se pot biosintetiza *polizaharide*, mai ales *amidon* și *celuloză*.

(a) Reacția fotochimică.

Trăsătura caracteristică a celulelor fotosintetizante constă în *capacitatea lor de a transforma energia luminoasă în energie chimică, acumulată sub formă de legături covalente în moleculele substanțelor organice sintetizate.* Un rol esențial în acest proces complex îl are prima etapă a fotosintezei, în decursul căreia energia luminoasă este absorbită de molecula clorofilei, care trece astfel într-o stare excitată. Cu o durată de ordinul 10^{-8} s, această stare de excitație realizează fotoliza apei și cedează energia acumulată:

$$H_2O \xrightarrow{h\nu} H + HO$$

În acest fel apare un potențial reducător (H) și un potențial oxidant (HO). Potențialul sau echivalentul reducător este utilizat sub formă de NADPH în etapa a doua a fotosintezei pentru biosinteza zaharurilor, iar potențialul oxidant generează oxigenul pe care plantele îl elimină:

$$2\ HO \longrightarrow H_2O + 1/2\ O_2$$

S-a stabilit că primii produși care pot fi identificați în plantele fotosintetizante sînt NADPH și ATP. În acești compuși, energia luminoasă absorbită de clorofilă este acumulată sub formă de energie chimică „potențială" transmisibilă celei de a doua etape a fotosintezei. Într-adevăr, în reacția „la întuneric" hidrogenul din NADPH este utilizat pentru reacțiile de reducere, iar energia legăturilor macroergice din ATP este înglobată în legăturile chimice ale substanțelor formate în cursul reacțiilor endergonice.

Formarea NADPH are loc între $NADP^+$, ca acceptor și „hidrogenul activ" degajat din reacția H i l l, demonstrată în 1937 prin folosirea de diverși oxidanți ca acceptori de hidrogen (notați cu *A*):

$$H_2O + A \xrightarrow[\text{cloroplaste}]{h\nu} AH_2 + 1/2\ O_2$$

În contrast cu *reducerea diverșilor acceptori artificiali de hidrogen*, folosiți de H i l l (ioni Fe^{3+}, benzochinonă, diferiți coloranți etc.) reducerea $NADP^+$ în cadrul reacției fotochimice realizată de către cloroplaste decurge numai în prezența enzimei numită *piridinnucleotid reductaza fotosintetică* (PPNR).

Formarea NADPH în cadrul reacției de lumină are loc conform ecuației:

$$2\ NADP^+ + 2\ H_2O \xrightarrow[\text{cloroplaste}]{h\nu,\ PPNR} 2\ NADPH + H^+ + O_2$$

După cum se observă, pentru fiecare moleculă de oxigen eliberată, rezultă două molecule de NADPH necesare asimilării unei molecule de CO_2.

Formarea ATP, cel de-al doilea produs primar, stabil, identificat în cadrul procesului de fotosinteză, are ca punct de plecare după cum a arătat A r n o n, ADP — care în cursul procesului de *fosforilare fotosin-*

tetică trece în ATP. Energia necesară formării unei noi legături macroergice în molecula ATP provine parţial din energia luminoasă absorbită de clorofilă.

Arnon a surprins două căi diferite ale fosforilării fotosintetice:

— *fosforilarea fotosintetică ciclică*, realizată în prezenţa unor sisteme redox: *feredoxină, plastochinonă, citocrom f* şi cu ajutorul luminii, în care singura modificare observabilă este transformarea ADP în ATP:

$$ADP + P \xrightarrow[\text{cloroplaste}]{h\nu,\ \text{feredoxina, plastochinona, citocrom f}} ATP$$

— *fosforilarea fotosintetică neciclică*, în care formarea ATP este însoţită de reducerea $NADP^+$:

$$2\ NADP^+ + 2\ H_2O + 2\ ADP + 2\ P \xrightarrow[\text{cloroplaste}]{h\nu,\ PPNR} 2\ NADPH + H^+ + 2\ ATP + O_2$$

În privinţa *mecanismului fosforilării fotosintetice* există două ipoteze: una, consideră fotoliza apei ca proces iniţial şi cealaltă, propusă şi dezvoltată de Arnon (1961) care consideră drept proces primar activarea unui electron al clorofilei la un nivel energetic superior.

Mecanismul bazat pe fotoliza apei presupune că în cazul fosforilării fotosintetice ciclice are loc o recombinare a unei părţi din H şi OH cu formarea apei. La această reacţie, care decurge în prezenţa luminii, participă citocromul *f*, care este oxidat de către OH şi citocromul b_6, care este redus de către H:

$$HO + \text{Cit.}f\ Fe^{2+} \xrightarrow{h\nu} HO^- + \text{Cit.}f\ Fe^{3+}$$

$$H + \text{Cit.}\ b_6\ Fe^{3+} \xrightarrow{h\nu} H^+ + \text{Cit.}\ b_6\ Fe^{2+}$$

$$H^+ + HO^- \longrightarrow H_2O\ (F = -56\ \text{kcal})$$

Reacţia exergonică pune în libertate energia necesară formării unei noi legături macroergice, prin sinteza unei molecule de ATP. Datorită reoxidării parţiale a hidrogenului rezultat în urma fotolizei apei, cantitatea de oxigen eliberată efectiv de plantă scade la aproximativ jumătate faţă de cantitatea totală de oxigen ce ar trebui să rezulte în cazul fotolizei apei.

În cazul fosforilării neciclice, mecanismul bazat pe fotoliza apei comportă reducerea $NADP^+$, în prezenţa PPNR, cu degajarea concomitentă a oxigenului. Fosforilarea este cuplată cu reacţia exergonică de oxidare a unui acceptor de hidrogen neidentificat, ce preia hidrogenul înainte ca acesta să fie fixat de $NADP^+$. Notînd cu *A* acceptorul neidentificat şi cu *I* intermediarul ce preia energia şi serveşte ca suport al legăturii macroergice, mecanismul fotofosforilării neciclice poate fi redat astfel:

$$H_2O + A \xrightarrow{h\nu,\ PPNR} AH_2 + 1/2\ O_2$$

$$AH_2 + NADP^+ + I \longrightarrow A \sim I + NADPH + H^+$$

$$A \sim I + ADP + P \longrightarrow A + I + ATP$$

$$NADP^+ + ADP + P + H_2O \longrightarrow NADPH + H^+ + ATP + 1/2\ O_2$$

A şi I se regenerează mereu şi procesul decurge continuu.

Cele două variante de fotofosforilare prezentate mai sus sînt asemănătoare cu fosforilarea oxidativă (v. cap. 16), ce are loc în decursul degradărilor oxidative: în ambele cazuri fosforilările sînt cuplate cu reacţii exergonice în care hidrogenul trece de la un acceptor la altul înainte de a participa la reacţia exergonică propriu-zisă.

Mecanismul bazat pe fluxul electronic. Arnon presupune că reacţia primordială este absorbţia de către clorofilă a unei cuante de lumină, urmată de expulzarea unui electron bogat în energie. Rezultatul reacţiei este trecerea clorofilei într-o stare oxidată, în care nu poate rămîne. Revenirea la starea iniţială este însoţită de recuperarea electronului expulzat. Această recuperare poate avea loc în mai multe feluri:

— recuperarea directă a electronului, fără ca acesta să participe la procesul de fosforilare fotosintetică. În acest caz, energia electronului expulzat apare ca energie luminoasă în cadrul fenomenului de fluorescenţă;

— recuperarea electronului după ce acesta parcurge lanţul de transporturi de electroni al fotofosforilării ciclice (feredoxină, plastochinonă, citocrom *f*), deci după acumularea energiei în legătura macroergică a ATP. În fotofosforilarea neciclică, electronul expulzat este preluat de $NADP^+$ (la plante) sau NAD^+ (la bacterii) şi în schimbul electronului pierdut, clorofila primeşte un electron provenit de la ionii HO^- ce iau naştere prin *ionizarea apei.*

Descărcarea ionilor HO^- prin transferarea electronului lor necesită o reacţie fotochimică adiţională la care *trebuie* să participe în mod obligatoriu un pigment diferit de clorofila *a* (fig. 14.2). Acest pigment poate

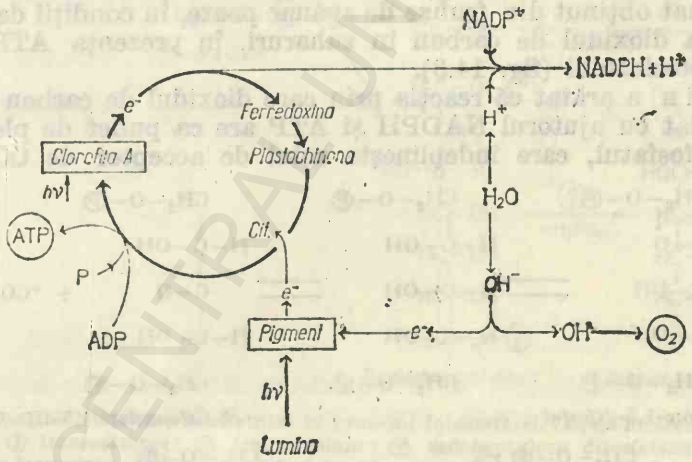


Fig. 14.2. — Fotofosforilarea ciclică şi neciclică explicată prin mecanismul bazat pe fluxul de electroni.

fi clorofila *b* sau un pigment „accesoriu", prezent numai în plantele superioare şi în algele producătoare de oxigen. Această situaţie este unică pentru plantele superioare, iar reacţia fotochimică asociată cu clorofila *a* este comună tuturor sistemelor fotosintetizante.

În privinţa energiei luminoase pentru reacţia fotochimică, cei mai mulţi cercetători consideră necesare opt cuante pentru fiecare moleculă

de oxigen (sînt cuantele efectiv absorbite, nu şi cele pierdute sub formă de căldură sau de radiaţie de fluorescenţă). Într-adevăr, dacă pentru reducerea fiecărei molecule de $NADP^+$ este necesară expulzarea a doi electroni şi în cursul procesului are loc două astfel de expulzări (fig. 14.2), iar patru electroni sînt necesari pentru eliberarea fiecărei molecule de

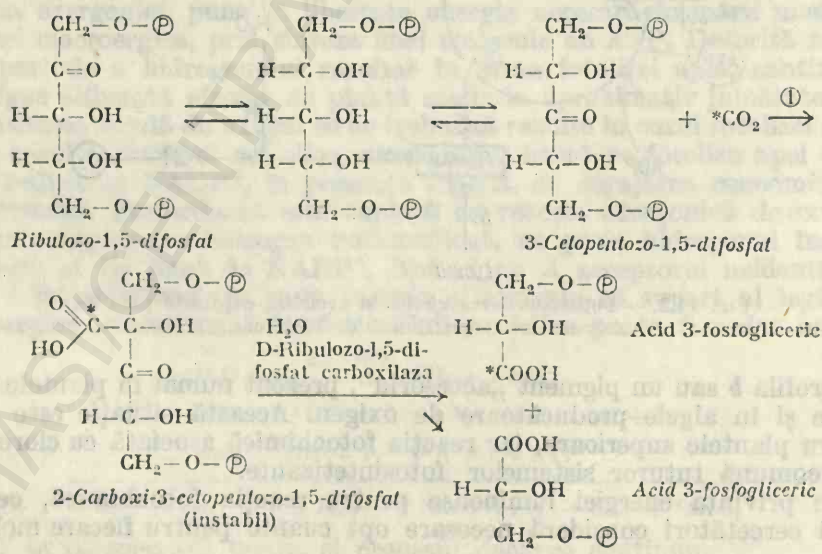
$$4\ HO^- \xrightarrow{-4e^-} 4\ HO \longrightarrow 2\ H_2O + O_2$$

oxigen calculele sînt justificate.

În concluzie, în reacţia fotochimică, energia luminoasă este utilizată pentru formarea NADPH şi ATP şi eliberarea oxigenului, care apare ca un produs final neutilizabil de către plantă. Componenta reducătoare (NADPH) va funcţiona ca atare în reacţiile chimice ale celei de a doua etape a fotosintezei, iar ATP va furniza în această fază energia necesară diverselor procese endergonice.

(b) Reacţia „la întuneric" (Asimilaţia CO_2). Utilizarea [1] CO_2 a făcut posibilă elucidarea mecanismului prin care are loc incorporarea acestuia în molecula glucidelor. Tehnicile experimentale moderne au permis separarea fizică a reacţiei fotochimice de reacţia de asimilare a CO_2 care nu necesită prezenţa luminii. Într-adevăr, grana separate de stroma pot degaja oxigenul şi forma NADPH şi ATP prin iluminarea cloroplastelor, în absenţa CO_2 (reacţia fotochimică). În stroma rămasă după îndepărtarea granelor, NADPH şi ATP, formate anterior în cursul reacţiei fotochimice, se observă asimilarea dioxidului de carbon în lipsa energiei luminoase (faza la întuneric). În acest sens, R a c k e r (1955) a arătat că un omogenat obţinut din frunze de spanac poate, în condiţii de întuneric, transforma dioxidul de carbon în zaharuri, în prezenţa ATP, NADPH şi ribulozofosfatului (fig. 14.3).

C a l v i n a arătat că reacţia prin care dioxidul de carbon radioactiv este asimilat cu ajutorul NADPH şi ATP are ca punct de plecare ribulozo-1,5-difosfatul, care îndeplineşte rolul de acceptor de CO_2:



Calvin și colab. (1947 — 1956), în lucrările efectuate cu $^{14}CO_2$ marcat, pe algele *Chlorella*, *Scenedesmus* au reușit să surprindă fazele intermediare ale formării zaharurilor, la intervale de timp de iluminare egale cu 0,1—5 s. Dioxidul de carbon se fixează pe molecula ribulozo-

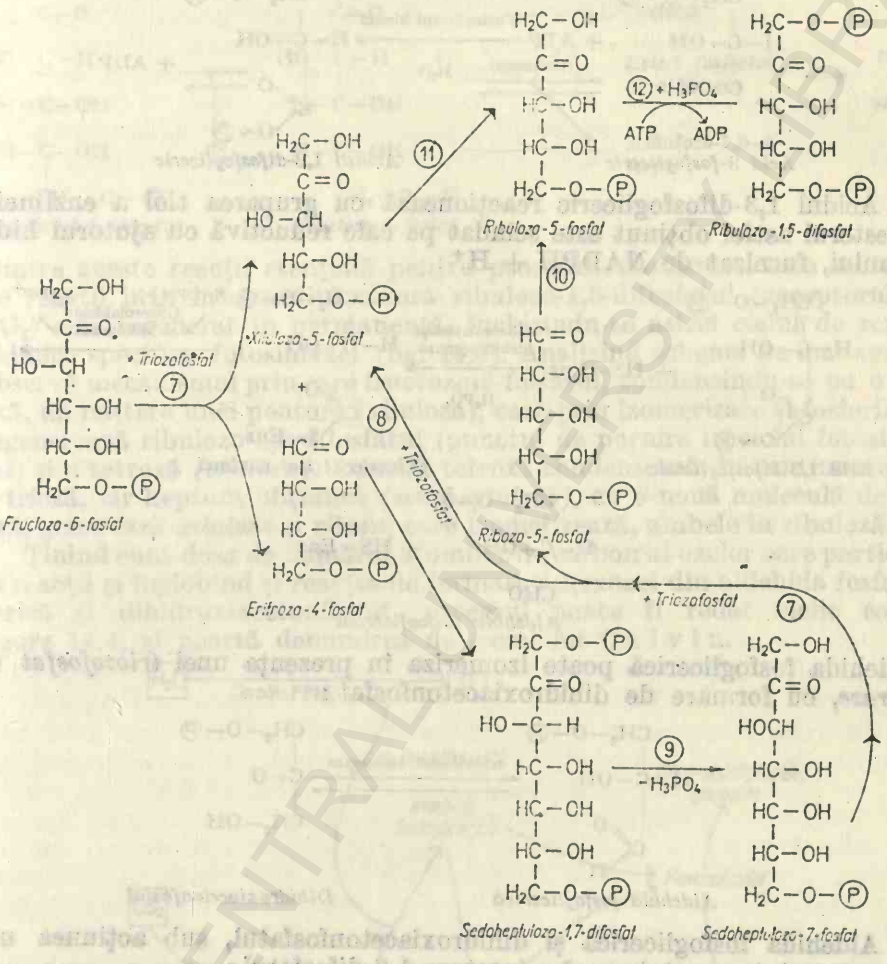
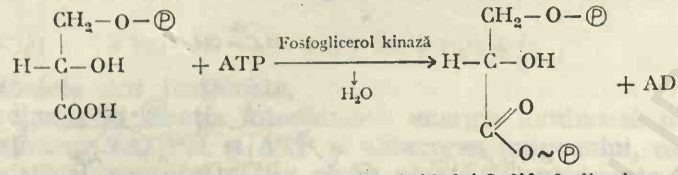


Fig. 14.3. — Rolul ribulozo-5-fosfatului în procesul fotosintezei. Cifrele încercuite indică enzimele: ⑦ transcetolaza; ⑧ transaldolaza; ⑨ sedoheptulozo difosfataza; ⑩ fosforibozo izomeraza; ⑪ ribulozo-5-fosfat epimeraza; ⑫ *D*-ribozo-5-fosfat kinaza.

-1,5-difosfatului printr-un mecanism care nu este cu certitudine stabilit. Existența 3-cetopentozei și a 2-carboxil-3-cetopentozei nu au putut fi dovedite experimental. Primul produs stabil evidențiabil, al reacției „la întuneric" este *acidul 3-fosfo liceric*. Enzimele care catalizează această reacție constituie, probabil, un complex multienzimatic, cunoscut global sub numele de *D-ribulozo-1,5-difosfat carboxilază* sau *carboxidismutază*.

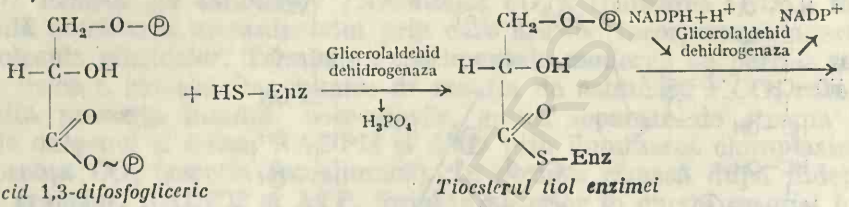
Acidul 3-fosfogliceric obținut este apoi redus cu ajutorul NADPH și ATP la *aldehidă 3-fosfoglicerică*. Intervenția ATP se realizează într-o

fază intermediară în care acesta reacţionează cu *acidul 3-fosfoglicerio*, dînd *acidul 1,3-difosfoglicerio*, în care a fost astfel înglobată o legătură macroergică a cărei energie este utilizată pentru depăşirea barierelor energetice care stau în calea reacţiei de reducere:

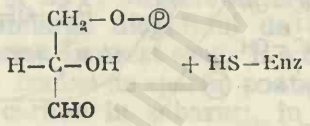


Acid 3-fosfoglicerie — *Acidul 1,3-difosfoglicerie*

Acidul 1,3-difosfoglicerie reacţionează cu gruparea tiol a enzimei şi tioesterul astfel obţinut este scindat pe cale reductivă cu ajutorul hidrogenului, furnizat de NADPH + H^+:

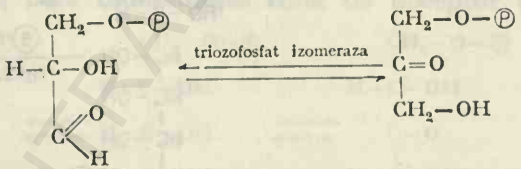


Acid 1,3-difosfoglicerie — *Tioesterul tiol enzimei*



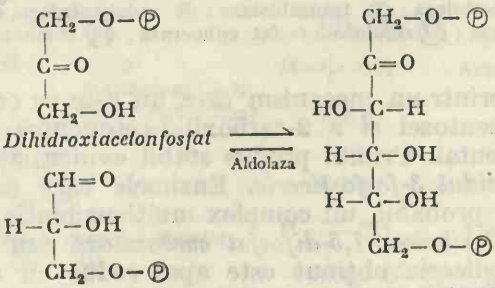
Aldehida fosfoglicerică

Aldehida fosfoglicerică poate izomeriza în prezenţa unei *triozofosfat izomeraze*, cu formare de dihidroxiacetonfosfat:



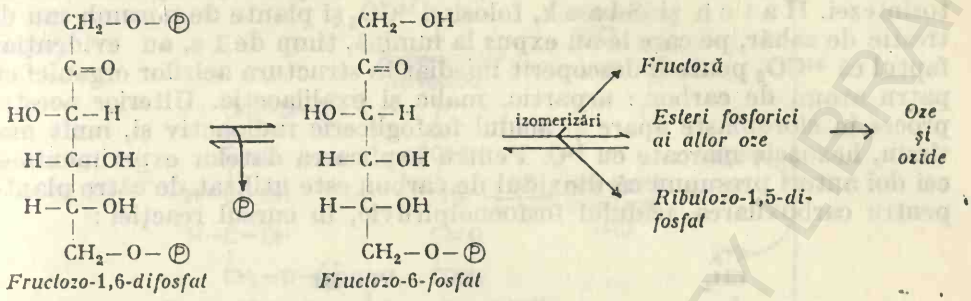
Aldehida fosfoglicerică — *Dihidroxiacetonfosfat*

Aldehida fosfoglicerică şi dihidroxiacetonfosfatul, sub acţiunea unei liaze trec într-o cetohexoză: fructozo-1,6-difosfatul:



Aldehida fosfoglicerică — *Fructozo-1,6-difosfat*

Fructoza-1,6-difosfatul poate trece enzimatic în fructozo-6-fosfat și fructoză sau prin diverse izomerizări în alte oze (*glucoză*, *manoză*, *galactoză* etc.), care apoi prin policondensare generează polizaharide (*amidon*, *celuloză*, *galactani*, *manani* etc.) :



Dintre aceste reacții esențială pentru procesul fotosintezei este secvența de reacții prin intermediul cărora ribulozo-1,5-difosfatul (acceptorul de CO_2) este regenerat în permanență, închizîndu-se astfel ciclul de reacții chimice specifice fotosintezei (fig. 14.3). Analizînd schema de mai sus, se observă mecanismul prin care fructozo-6-fosfatul, condensîndu-se cu o trioză, dă naștere unei pentoze (xiluloza), care prin izomerizare și fosforilare, regenerează ribulozo-1,5-difosfatul (punctul de pornire în ciclul fotosintezei) și o tetroză *(eritroza)*. Această tetroză condensează, în continuare, cu o trioză, iar heptoza obținută *(sedoheptuloza)*, cu o nouă moleculă de trioză, generează *xiluloza* și *riboza*, care izomerizează, ambele în ribuloză.

Ținînd cont doar de numărul atomilor de carbon ai ozelor care participă la reacții și înglobînd și reacția de formare a hexozei din aldehida fosfoglicerică și dihidroxiacetonfosfat, procesul poate fi redat ciclic ca în figura 14.4, și poartă denumirea de ciclul lui C a l v i n.

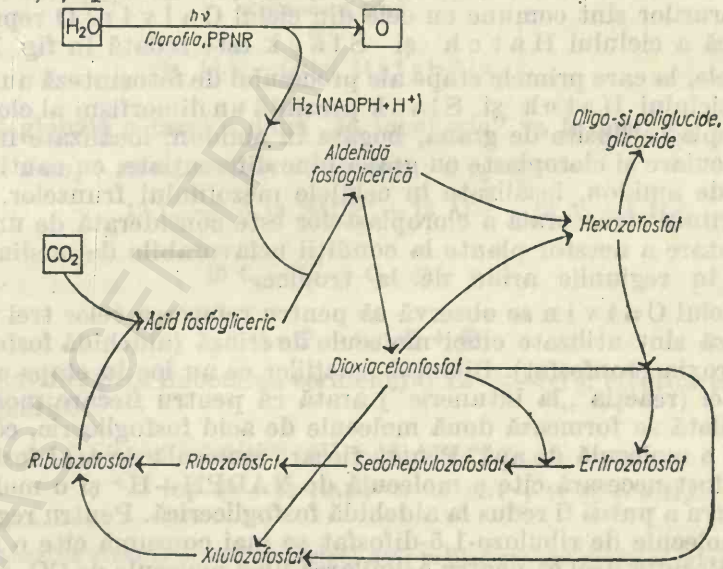
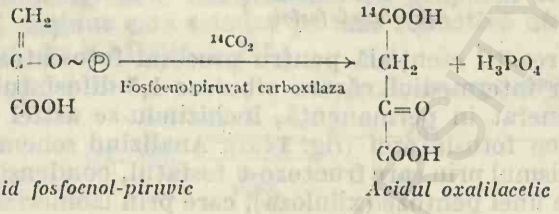


Fig. 14.4. — Interdependența dintre diferitele oze în cursul procesului de fotosinteză.

Ciclul H a t c h și S l a c k. Cercetările efectuate în ultimii zece ani asupra procesului de fotosinteză, la unele plante — porumb, trestie de zahăr, sorg, *Amaranthus*, *Atriplex*, *Cyperus* și alte specii ierboase tropicale — au scos în evidență unele particularități în privința produșilor primari ai fotosintezei. H a t c h și S l a c k, folosind $^{14}CO_2$ și plante de porumb sau de trestie de zahăr, pe care le-au expus la lumină, timp de 1 s, au evidențiat faptul că $^{14}CO_2$ poate fi descoperit imediat în structura acizilor organici cu patru atomi de carbon : aspartic, malic și oxalilacetic. Ulterior acestui proces în cloroplaste apare și acidul fosfogliceric radioactiv și, mult mai tîrziu, hexozele marcate cu ^{14}C. Pentru explicarea datelor experimentale, cei doi autori presupun că dioxidul de carbon este utilizat de către plante pentru carboxilarea acidului fosfoenolpiruvic, în cursul reacției :



Acid fosfoenol-piruvic *Acidul oxalilacetic*

Acidul oxalilacetic poate trece în cursul unor reacții catalizate enzimatic în acid malic sau în acid aspartic, deci într-un acid C 4 dicarboxilic. Acest acid C 4 dicarboxilic reacționează ulterior cu ribulozo-1,5-difosfatul, în prezența *transcarboxilazei* și trece în acid fosfogliceric și acid piruvic. Ultimul este fosforilat enzimatic de către fosfoenolpiruvat sintetaza cu refacerea fosfoenolpiruvatului care reia ciclul H a t c h și S l a c k.

După formarea acidului fosfogliceric, reacțiile care conduc la biosinteza zaharurilor sînt comune cu cele din ciclul C a l v i n. O reprezentare schematică a ciclului H a t c h și S l a c k este redată în fig. 14.5.

Plantele, la care primele etape ale procesului de fotosinteză au loc după reacțiile ciclului H a t c h și S l a c k prezintă un dimorfism al cloroplastelor : cloroplaste lipsite de grana, bogate în amidon, localizate în celulele tecii fasciculare și cloroplaste cu grana bine diferențiate, cu cantități relativ mici de amidon, localizate în celulele mezofilului frunzelor. Această particularitate structurală a cloroplastelor este considerată de unii autori ca o adaptare a acestor plante la condiții nefavorabile de mediu, care se întîlnesc în regiunile aride de la tropice.

Din ciclul C a l v i n se observă că pentru refacerea celor trei molecule de riboluză sînt utilizate cinci molecule de trioză (aldehidă fosfoglicerică sau dihidroxiacetonfosfat). Bilanțul reacțiilor ce au loc în etapa a doua a, fotosintezei (reacția „la întuneric") arată că pentru fiecare moleculă de CO_2 asimilată se formează două molecule de acid fosfogliceric, consumîndu-se cîte o moleculă de apă. Pentru fiecare moleculă de acid fosfogliceric format a fost necesară cîte o moleculă de $NADPH+H^+$ și o moleculă de ATP, pentru a putea fi redus la aldehidă fosfoglicerică. Pentru regenerarea fiecărei molecule de ribulozo-1,5-difosfat se mai consumă cîte o moleculă de ATP. Rezultă deci că pentru asimilarea unei molecule de CO_2 sînt necesare două molecule de NADPH și trei molecule de ATP.

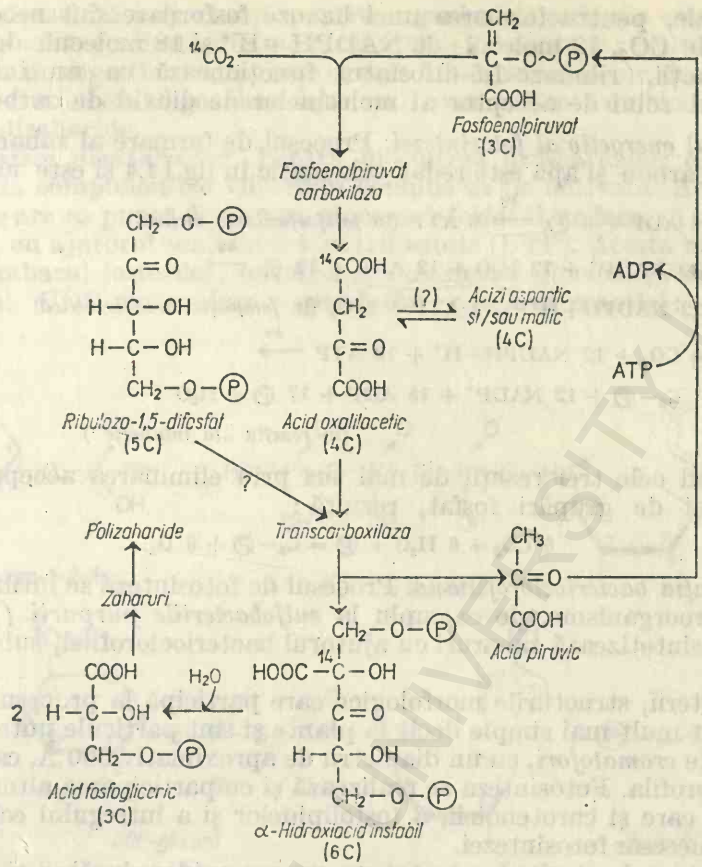


Fig. 14.5. — Ciclul H a t c h-S l a c k.

Ecuația globală a fazei a doua „la întuneric" va fi deci :*

$$6\ CO_2 + 12\ NADPH + H^+ + 18\ ATP + 6\ C_5{-}Ⓟ \longrightarrow$$
$$12\ C_3{-}Ⓟ + 12\ NADP^+ + 18\ ADP + 12\ Ⓟ + 6\ H_2O$$

Dar,

$$10\ C_3{-}Ⓟ = 6\ C_5{-}Ⓟ + 4\ Ⓟ$$

iar,

$$2\ C_3{-}Ⓟ = C_6{-}Ⓟ + Ⓟ$$

și ecuația devine, prin înlocuirea termenului 12 C_3—Ⓟ și efectuarea operațiunilor algebrice :

$$6\ CO_2 + 12\ NADPH + H^+ + 18\ ATP \longrightarrow$$
$$C_6{-}Ⓟ + 12\ NADP^+ + 18\ ADP + 17\ Ⓟ + 6\ H_2O$$

* Stoichiometria ecuației nu este respectată doar în mod aparent deoarece cele șase molecule de apă sînt necesare pentru scindarea 2-carboxi-3-cetopentozo-1,5-difosfatului în două molecule de acid 3-fosfogliceric.

În concluzie, pentru formarea unei hexoze fosforilate sînt necesare șase molecule de CO_2, 12 molecule de $NADPH+H^+$ și 18 molecule de ATP. În aceste reacții, ribulozo-1,5-difosfatul funcționează ca un intermediar îndeplinind rolul de acceptor al moleculelor de dioxid de carbon.

Bilanțul energetic al fotosintezei. Procesul de formare al zaharurilor din dioxid de carbon și apă este redat schematic în fig.14.4 și este următorul :

$$6\ ADP + 6\ Ⓟ \xrightarrow{h\nu} 6\ ATP \quad (\text{în } \textit{fotofosforilarea ciclică})$$

$$12\ NADP^+ + 12\ H_2O + 12\ ADP + 12\ Ⓟ \xrightarrow{h\nu}$$

$$12\ NADPH+H^+ + 12\ ATP + 6\ O_2 \quad (\text{în } \textit{fotofosforilarea neciclică})$$

$$6\ CO_2 + 12\ NADPH+H^+ + 18\ ATP \xrightarrow{h\nu}$$

$$C_6-Ⓟ + 12\ NADP^+ + 18\ ADP + 17\ Ⓟ + H_2O$$

(în *reacția „la întuneric"*)

Simplificînd cele trei reacții de mai sus prin eliminarea acceptorilor de hidrogen și de grupări fosfat, rezultă :

$$6\ CO_2 + 6\ H_2O + Ⓟ = C_6-Ⓟ + 6\ O_2$$

Asimilația bacterioclorofiliană. Procesul de fotosinteză se întîlnește și la unele microorganisme, de exemplu la *sulfobacteriile purpurii (Thiorodaceae)* care sintetizează zaharuri cu ajutorul bacterioclorofilei, sub acțiunea luminii.

La bacterii, structurile morfologice care participă la procesul de fotosinteză sînt mult mai simple decît la plante și sînt particule puternic colorate numite *cromatofori*, cu un diametru de aproximativ 300 Å, care conțin bacterioclorofila. Fotosinteza se realizează și cu participarea altor pigmenți, printre care și carotenoizii, a fosfolipidelor și a întregului echipament enzimatic necesar fotosintezei.

Fotosinteza bacteriană este tot un proces oxidoreducător și se deosebește de asimilația clorofiliană prin faptul că reducerea CO_2 se face cu ajutorul hidrogenului sulfurat, bacteriile punînd în libertate în loc de oxigen — sulf. În acest caz, ecuația globală a asimilației bacterioclorofiliene este :

$$6\ CO_2 + 12\ H_2S \xrightarrow{h\nu} C_6H_{12}O_6 + 6\ H_2O + 12\ S$$

Reacția primară a fotosintezei la bacterii este conform ipotezei lui V a n N i e l, tot fotoliza apei. În asimilația bacterioclorofiliană, hidrogenul este utilizat pentru reducerea dioxidului de carbon în timp ce radicalul HO oxidează hidrogenul sulfurat, regenerînd apa :

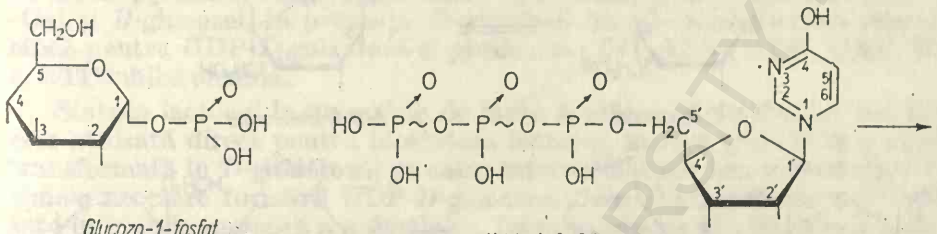
$$2\ HO + H_2S = 2\ H_2O + S$$

14.1.3 Biosinteza oligozaharidelor

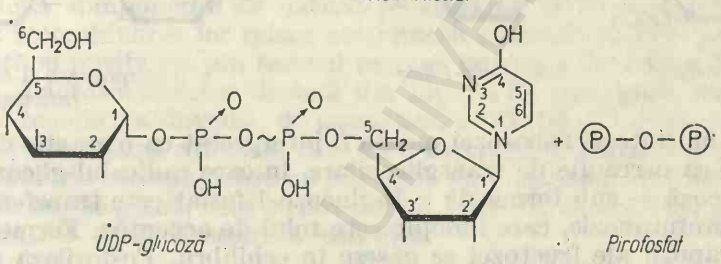
Biosinteza oligo- și poli-zaharidelor în organismele vegetale reprezintă un proces postbiosintetic, de transformare enzimatică a monozaharurilor, rezultate în cursul fotosintezei în compuși polimeri, cu mase moleculare, încadrate în limite largi.

De o deosebită importanță pentru organismele animale este *glicogenogeneza hepatică*, realizată din monozaharurile alimentare rezultate în urma procesului de digestie și absorbție și care în majoritatea lor sînt de origine vegetală. Biosinteza oligozaharidelor va fi exemplificată cu biosinteza principalelor dizaharide.

Biosinteza dizaharidelor. Pentru biosinteza dizaharidelor este necesar ca una din componentele viitorului compus să fie activată. Această activare, care are ca punct de plecare glucozo-1-fosfatul, se face, în majoritatea cazurilor, cu ajutorul acidului uridin trifosforic (UTP). Acesta reacționează cu monozaharul fosforilat, formînd uridindifosfat-glucoza (UDP-Glc), sau în general, UDP-monozahar și pirofosfat, conform reacției:



Glucozo-1-fosfat *Uridin trifosfat*



UDP-glucoză *Pirofosfat*

Pentru uridindifosfat-glucoză există în celulă multiple posibilități de transformare, care în ultimă instanță conduc la o mare varietate de dizaharide sintetizate.

Transformarea uridindifosfat-glucozei (UDP—Glc) sub influența 4-epimerazei (numită și galactowaldenază) dă naștere uridindifosfat-galactozei (UDP-Gal):

$$\text{UDP-Glc} \xrightleftharpoons{\text{UDP-Glc 4-epimeraza}} \text{UDP-Gal}$$

Același rezultat se obține și în prezența enzimei *glucozo-1-fosfat uridil transferazei*, cînd UDP-Glc reacționează cu esterul fosforilat al galactozei, galactozo-1-fosfatul:

$$\text{UDP—Glc} + \text{galactozo-1-}\textcircled{P} \rightleftharpoons \text{UDP-Gal} + \text{Glucozo-1-}\textcircled{P}$$

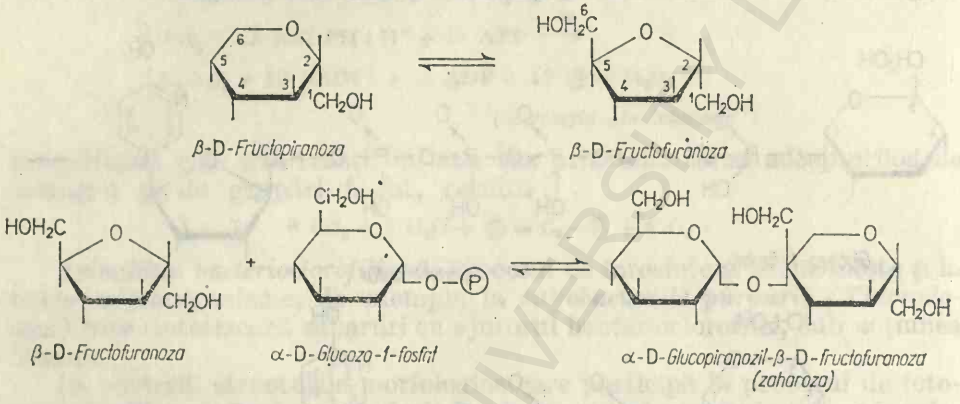
Atît UDP-Glc cît și UDP-Gal pot apoi reacționa cu alte monozaharuri fosforilate conducînd la biosinteza de dizaharide. În toate aceste reacții, UDP îndeplinește rolul de coenzimă (v. tabelul 5.3 la pag. 194).

Dintre toate monozaharurile obișnuite, manoza face excepție deoarece activarea ei se realizează cu formare de guanozindifosfatmanoză (GDP-Man).

Biosinteza zaharozei. Zaharoza este un dizaharid extrem de răspîndit, în exclusivitate în regnul vegetal, unde se acumulează în cantităţi foarte mari (trestia de zahăr, sfecla de zahăr). Zaharoza este stocată în plante ca produs secundar al fotosintezei, biosinteza ei decurgînd şi în lipsa luminii. Într-adevăr, s-a demonstrat că frunzele de sfeclă de zahăr infiltrate cu diverse monozaharuri şi ţinute la întuneric sintetizează cu o viteză relativ mare zaharoza.

Biosinteza zaharozei în organismele vegetale se realizează enzimatic pe mai multe căi :

— *din glucozo-1-fosfat şi fructoză,* sub acţiunea *fosforilazei zaharozei* :



Procesul biosintezei zaharozei, poate fi interpretat ca o reacţie de condensare, sau ca o reacţie de transglicozilare, în care radicalul glicozil, format de la glucoză — sub formă de α-*D*-glucozo-1-fosfat este transferat radicalului fructofuranozic, care îndeplineşte rolul de acceptor. Formele piranozil şi furanozil ale fructozei se găsesc în echilibru. Fosforilaza zaharozei, izolată din *Pseudomonas sp.* poate realiza această sinteză şi *in vitro.* Mecanismul prin care această enzimă realizează sinteza poate fi redat în felul următor :

$$\text{Glucozo-1-fosfat} + \text{Enz} \rightleftharpoons \text{Glucozil-Enz} + \text{Ⓟ}$$

$$\text{Glucozil-Enz} + \text{Fructoză} \rightleftharpoons \text{Zaharoză} + \text{Enz}$$

Fosforilaza zaharozei este o enzimă cu o mare specificitate pentru *D*-glucoză, fiind mai puţin specifică pentru *D*-fructoză, care în cursul reacţiei poate fi substituită cu numeroase alte cetoze, dînd naştere la analogi ai zaharozei :

α-*D*-Glucozo-1-Ⓟ + *L*-Arabinoză ⇌ 3-*O*-α-*D*-Glucopiranozil-*L*-arabinopiranoză + Ⓟ

α-*D*-Glucozo-1-Ⓟ + *L*-Sorboză ⇌ α-*D*-Glucopiranozil-α-*L*-sorbofuranoză + Ⓟ

Microorganismele *Pseudomonas saccharophila, Pseudomonas putrifaciens* şi *Leuconostoc mesenteroides* au o fosforilază care hidrolizează zaharoza, în prezenţa fosfatului anorganic, ceea ce demonstrează şi reversibilitatea reacţiei în favoarea sintezei de zaharoză ;

— *la plantele superioare, zaharoza este biosintetizată din UDP-Glc şi fructoză,* sub acţiunea *zaharozo sintetazei* :

$$\text{D-Fructoză} + \text{UDP-Glc} \xrightleftharpoons{\text{zaharozo sintetaza}} \text{Zaharoză} + \text{UDP}$$

— *din fructozo-6-fosfat și UDP-Glc*, sub influența *zaharozofosfat sintetazei*. Leloir și colab. au arătat că în germenii de grîu rezultă zaharoză monofosforilată :

D-Fructozo-6-fosfat + UDP-Glc $\rightleftharpoons$ Zaharozomonofosfat + UDP

Zaharozomonofosfatul este hidrolizat de fosfatază cu punerea în libertate a zaharozei și fosfatului. Zaharozofosfat sintetaza care a fost izolată de la plante are o activitate mult mai mare decît zaharozo sintetaza.

Biosinteza lactozei. Sinteza lactozei a fost pentru prima dată realizată folosindu-se fracția celulară particulată, obținută din glanda mamară a bovinelor, și are loc după un mecanism care rezidă în condensarea UDP-*D*-Gal și *D*-glucozei, în prezența *D-galactozil transferazei*. Enzima este specifică pentru UDP-*D*-galactoză și pirofosfat ; ITP, UTP, UDP, UMP, TTP și GTP inhibă enzima.

Sinteza lactozei la animalele de lapte a arătat că *D*-glucoza din sînge este utilizată direct pentru biosinteza lactozei, însă ea trebuie în prealabil transformată în *D*-galactoză, pe calea intermediarilor hexozofosforici. Enzimele necesare formării UDP-*D*-galactozei din *D*-glucoză au fost localizate în glanda mamară a animalelor. *Lactozosintetaza* din lapte este alcătuită din două componente de natură proteică (*A* și *B*) care separat sînt inactive ; recombinarea lor reface activitatea enzimatică. Fracția *B* care a fost izolată și purificată din țesutul mamar bovin s-a dovedit a fi o α-lactalbumină. Lactozosintetaza izolată din laptele de oaie, porc, capră și din laptele de femeie s-a dovedit, de asemenea, alcătuită din două componente, *A* și *B*, de natură proteică, care au o secvență primară în componenta *B* remarcabil de asemănătoare cu secvența aminoacizilor din *muramidaza*, izolată din oul de găină, ceea ce dovedește, probabil că aceste două enzime provin dintr-o genă ancestrală comună.

Biosinteza trehalozei. Dizaharidul α-*D*-glucopiranozil-α-*D*-glucopiranozid este sintetizat de complexul enzimatic izolat de la drojdii și de la insecte, în cursul a două reacții succesive :

$$\text{UDP-Glc} + \textit{D}\text{-Glucozo-6-Ⓟ} \xrightarrow{\text{transferază}} \alpha,\alpha'\text{-Trehalozo-6-Ⓟ} + \text{UDP}$$

$$\alpha,\alpha'\text{-Trehalozo-6-Ⓟ} \xrightarrow{\text{fosfataza}} \alpha,\alpha'\text{-Trehaloză} + \text{Ⓟ}$$

14.1.4 Biosinteza polizaharidelor

Dintre numeroasele polizaharide cu o răspîndire deosebită în natură, fac parte amidonul și glicogenul.

14.1.4.1 Biosinteza amidonului

Acest polizaharid se formează în plante în urma unui proces postbiosintetic al fotosintezei, prin condensarea moleculelor de glucoză. Sinteza amidonului se poate realiza fără participarea energiei luminoase. În plante

a fost descrisă o enzimă capabilă de a forma legături α-1,4-glicozidice, ce dă naştere lanţului linear al amilozei *(fosforilaza amidonului* sau *„P-enzima")* şi enzima care poate ramifica molecula, formînd amilopectina („*Q*-enzima"). În 1961 a fost descoperită o a treia enzimă — *sintetaza amidonului* — care foloseşte ca donor de grupări glicozil, în sinteza amidonului, UDP-Glc sau ADP-Glc.

Fosforilaza amidonului catalizează reacţia de transfer a unui rest glucozil la un acceptor reprezentat de un oligozaharid sau de un polizaharid, cu grad de policondensare mic. Cea mai mică moleculă care poate servi drept acceptor al restului de glucoză este *maltotetroza* (un tetrazaharid). Oligozaharidele cu mai multe resturi de glucoză sînt mai active în această reacţie, maximul de eficienţă întîlnindu-se în cazul moleculelor care conţin circa 20 de resturi glucozil. Reacţia generală catalizată de fosforilaza amidonului poate fi reprezentată prin ecuaţia :

$$\text{Glucozo-1-Ⓟ} + \text{Acceptor} \xrightarrow{\text{Fosforilaza amidonului}} \text{1,4-Glucozil-Acceptor} + \text{Ⓟ}$$

Dacă acceptorul este maltotetroza, atunci rezultatul reacţiei este formarea maltopentozei care, funcţionînd în continuare ca acceptor conduce la obţinerea maltohexozei etc. Această reacţie se poate repeta de *n* ori şi rezultatul ei poate fi biosintetizarea unei catene lineare lungi care poate conţine 10 000 — 20 000 resturi de glucoză.

Enzima „Q" este o transglicozilază care transferă o porţiune (un lanţ de 14 — 20 resturi de glucoză, legate în poziţia 1,4) din catena lineară a amilozei, în poziţia 6 a unui rest de glucoză care face parte din molecula unui acceptor. Acesta din urmă s-a dovedit a fi la temperatura de 30°C un polizaharid care conţine cel puţin 35 — 40 resturi de glucoză. Enzima „Q" poate, deci, transforma amiloza în amilopectină. Cînd acceptorul are o structură ramificată amilopectina, de exemplu enzima de ramificare induce o ramificare suplimentară a polimerului, dînd naştere la polimeri asemănători ca structură moleculei de glicogen. La temperaturi cuprinse între 0° şi 10°C acceptorul resturilor glicozil poate fi un oligozaharid care conţine 15 — 20 resturi de glucoză. Efectul temperaturii asupra biosintezei amidonului este pus de unii autori pe seama conformaţiei moleculei de amidon (dublu helix, F r e n c h, 1974).

Sintetaza amidonului, localizată în plastide, poate realiza biosinteza amidonului şi alungirea catenei acestuia folosind în calitate de donori glicozil atît ADP-Glc cît şi UDP-Glc, în cursul unei reacţii de tipul :

$$\text{ADP-Glc (UDP-Glc)} + (\text{Acceptor})_n \rightarrow (\text{Acceptor})_{n+1} + \text{ADP (UDP)}$$

L e l o i r, F e k e t e şi C a r d i n i (1961), R e c o n d o şi L e l o i r (1961) au arătat că donorul normal de glicozil este ADP-Glc, mai curînd decît UDP-Glc.

Alte enzime care intervin în biosinteza amidonului. La unele plante, în cursul procesului de biosinteză a amidonului intervin şi alte enzime. Astfel, *UDP-Glc transglicozilaza* catalizează reacţia de transfer a unui rest de glucoză de la UDP-Glc, pe un acceptor oarecare, care poate fi maltoza, maltotrioza, maltotetroza — dar niciodată, glucoza :

$$\text{UDP—Glc} + \text{Acceptor} \rightleftharpoons \text{1,4-Glucozil-Acceptor} + \text{UDP} \quad (\text{UDP-Glc transglicozilaza})$$

Enzima „D" a cărei prezenţă a fost semnalată în cartofi, catalizează reacţia de transfer a restului unui zaharid alcătuit din cel puţin două molecule de glucoză, la atomul C_4 al unui acceptor oligozaharidic. Dacă restul glicozil transferat şi acceptorul reprezintă una şi aceeaşi moleculă, are loc o reacţie de „disproporţionare" (de unde şi denumirea enzimei), ca în exemplul următor :

$$\text{Maltotrioză} + \text{Maltotrioză} \xrightarrow{\text{„Enzima D"}} \text{Maltopentoză} + \text{Glucoză}$$

Acceptorul cel mai mic poate fi o moleculă de maltotrizaharid.

14.1.4.2 Biogeneza glicogenului hepatic *. Glicogenogeneza, transglucozilarea şi glicogenoneogeneza

Glicogenogeneza şi glicogenoneogeneza hepatică reprezintă procesele cu ajutorul cărora organismele animale pot sintetiza în ţesutul hepatic glicogen, fie pornind direct de la monozaharuri *(glicogenogeneza)*, fie de la componente neglucidice *(glicogenoneogeneza)*. Ficatul este singurul organ care, chiar în cazul unei alimentaţii sărace în glucide poate, folosind metaboliţii comuni rezultaţi din catabolismul glucidelor, lipidelor şi protidelor să realizeze sinteza glucozei, respectiv a glicogenului.

Glicogenul hepatic reprezintă principala rezervă de glucide a organismului din care după necesităţi, sînt cedate, după scindare, diverse can-

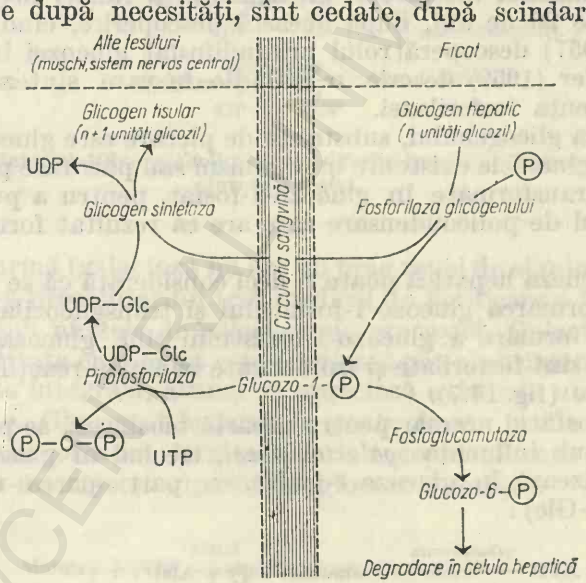


Fig. 14.6. — Rezervele de glucoză din organism şi interrelaţiile dintre glicogenul hepatic şi glucoza sanguină.

tităţi de glucoză şi altor organe sau ţesuturi, care conţin şi ele, dar în cantitate mai mică, acest polizaharid sub formă de glicogen muscular, glicogen celular etc. Transportul rezervelor de glucoză din organism se efectuează conform figurii 14.6.

* Biosinteza glicogenului muscular şi reglarea ei nu vor fi tratate.

Sinteza glicogenului poate fi efectuată, în cantități relativ neînsemnate, atît de către țesutul muscular, cît și la nivelul celulelor, însă numai țesutul hepatic poate resintetiza, în cantități mari față de propriile lui nevoi, glicogen din acid lactic (v. glicogenoneogeneza). Faptul are o semnificație deosebită, pe de o parte, pentru că acidul lactic reprezintă un produs de degradare constant în decursul catabolizării glucidelor, iar pe de altă parte, pentru că în țesutul muscular (mare consumator de glicogen, respectiv de glucoză) resinteza glicogenului se face în cantități insuficiente pentru a satisface necesitățile energetice, impuse de travaliul muscular. Țesutul muscular (0,3 — 0,9 % glicogen) este deci tributar din acest punct de vedere țesutului hepatic (3 — 6% glicogen).

Glicogenogeneza hepatică. Depozitarea zaharurilor sub formă de glicogen hepatic începe după $^1/_2$ oră de la ingerarea zaharurilor, atingînd valoarea maximă după aproximativ trei ore. Sinteza glicogenului reprezintă un proces endergonic în care energia necesară policondensării moleculelor de glucoză rezultă prin degradarea oxidativă totală, cu formare de dioxid de carbon și apă (proces exergonic) a circa 10% din cantitatea de glucoză disponibilă (pentru policondensarea a 100 g glucoză sînt degradate oxidativ 10,6 g glucoză).

Prima sinteză a glicogenului *in vitro* a fost realizată de C o r i, S c h m i d t și C o r i în 1939 din glucozo-1-fosfat, în prezența fosforilazei hepatice. Mecanismul biosintezei glicogenului a rămas neclarificat timp de mai bine de 20 de ani, după această descoperire, cînd L e l o i r și C a r d i n i (1957) descoperă rolul uridindifosfat glucozei în această sinteză, iar Mahler (1959) descrie o maladie în care sinteza glicogenului are loc în absența fosforilazei.

În biogeneza glicogenului, substanța de plecare este glucozo-1-fosfatul, astfel că toate glucidele existente în organism sau pătrunse pe cale alimentară trebuie transformate în glucozo-1-fosfat, pentru a putea participa apoi la procesul de policondensare care are ca rezultat formarea glicogenului.

Glicogenogeneza hepatică poate fi deci considerată că se desfășoară în două etape : formarea glucozo-1-fosfatului și transglicozilarea.

Sursele de formare a glucozo-1-fosfatului sînt glucoza, fructoza și galactoza, care sînt fosforilate și izomerizate în cursul reacțiilor enzimatice corespunzătoare (fig. 14.7).

Glucozo-1-fosfatul necesar pentru această biosinteză se poate forma și din galactoză sub influența *galactokinazei*, trecînd în galactozo-1-fosfat, care se izomerizează în glucozo-1-fosfat, cu participarea uridindifosfat-glucozei (UDP-Glc) :

$$\text{Galactoză} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{galactokinaza}} \text{Galactozo-1-Ⓟ} + \text{ADP}$$

$$\text{Galactozo-1-Ⓟ} + \text{UDP—Glc} \xrightleftharpoons{\text{glucozo-1-fosfaturidil transferaza}} \text{UDP-Gal} + \text{Glucozo-1-Ⓟ}$$

$$\text{UDP-Gal} \xrightleftharpoons{\text{4-epimeraza (galactowaldenaza)}} \text{UDP-Glc}$$

Însumînd ultimele două ecuații, se obține :

$$\text{Galactozil-1-Ⓟ} \rightleftharpoons \text{Glucozil-1-Ⓟ}$$

De remarcat că numai țesutul hepatic este capabil să realizeze această transformare, respectiv să utilizeze galactoza pentru sinteza glicogenului. Experiențele realizate pe animale cărora li s-a extirpat ficatul, demonstrează că întreaga cantitate de galactoză administrată acestor animale a

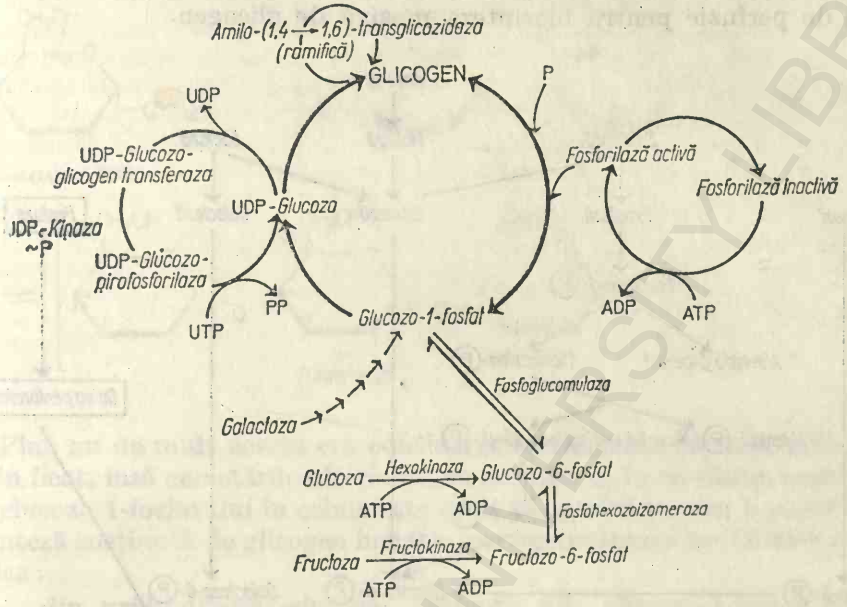


Fig. 14.7. — Interrelațiile metabolice dintre diferite hexoze și formarea esterului glucozo-1-fosfat.

fost regăsită în urină (galactoza nu are un prag renal de eliminare). Pe baza acestor fapte, s-a preconizat un test medical de verificare a funcției hepatice, cunoscut sub numele de *galactozemie provocată*. Galactoza administrată într-o cantitate cunoscută este eliminată pe cale urinară : dacă această eliminare este integrală, atunci se apreciază existența unei dereglări a funcției hepatice. Glucozo-1-fosfatul se poate forma și din *manoză*, sub influența unei *hexozokinaze*, formîndu-se la început manozo-6-fosfat, care trece în glucozo-6-fosfat și ulterior în glucozo-1-fosfat :

$$\text{Manoză} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{kinază}} \text{Manozo-6-Ⓟ} + \text{ADP}$$

$$\text{Manozo-6-Ⓟ} \rightleftharpoons \text{Glucozo-6-Ⓟ} \rightleftharpoons \text{Glucozo-1-Ⓟ} \quad (\text{epimerază})$$

Glucozo-1-fosfatul se formează și din pentoze, printr-un proces mai complex, în cadrul transformărilor cunoscute, sub denumirea de *ciclul pentozofosfaților*.

Transformările suferite de diversele glucide, cu formare de glucozo-1-fosfat sînt redate schematic în fig. 14.8.

Dovada posibilității utilizării tuturor hexozelor de către ficat pentru biosinteza glicogenului a fost făcută cu ajutorul tehnicii ficatului perfuzat. S-a demonstrat că celulele hepatice folosesc diverse hexoze prezente în soluția de perfuzie pentru biosinteza masivă de glicogen.

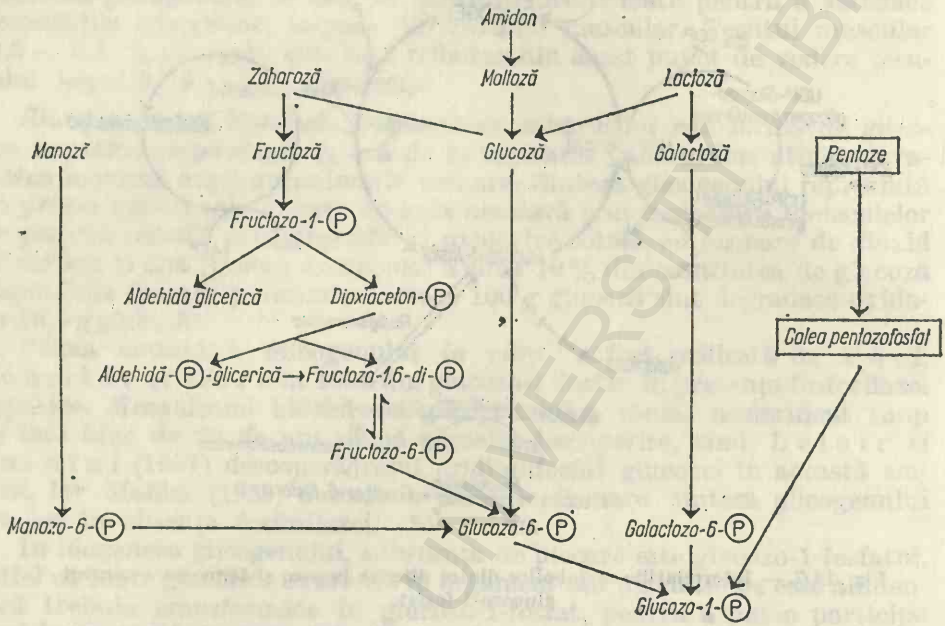
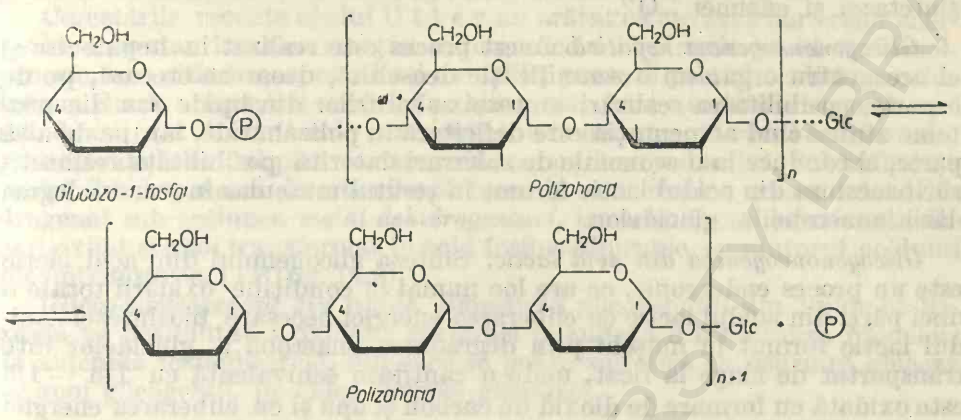


Fig. 14.8. — Formarea hexozelor fosforilate din precursori de natură diferită.

În prima etapă de sinteză a glicogenului, glucozo-1-fosfatul este transformat, în prezența unei *UDP-Glc pirofosforilaze* specifice și în cursul unei reacții reversibile în UDP-Glc. Reacția următoare este ireversibilă și are loc în prezența unei mici cantități de glicogen, care servește drept *amorsă* sau *acceptor* și a *glicogen sintetazei* UDP-Glc, formînd cu un rest de glucoză din glicogen o legătură glucozidică α-1,4. Această reacție este stimulată de insulină și de glucozo-1-fosfat. Cînd lanțul polizaharidului conține aproximativ 8 — 11 resturi de glucoză, o „enzimă de ramificare" denumită *amilo-1,4→1,6-transglucozilaza*, transferă trei sau mai multe unități de glucoză de la extremitatea acestei catene polizaharidice la o altă catenă polizaharidică, cu formarea unei legături glucozidice α-1,6 și apariția unei catene laterale, dînd naștere astfel unui polizaharid ramificat. Această operație, dublată de interacțiunea în timp și în spațiu dintre glicogen sintetază și amilo-1,4→1,6-transglicozilază, se repetă în prezența unei cantități corespunzătoare de glucozo-1-fosfat pînă la obținerea unei molecule de glicogen, a cărui sinteză nu mai poate fi continuată din cauza impedimentelor de ordin steric.

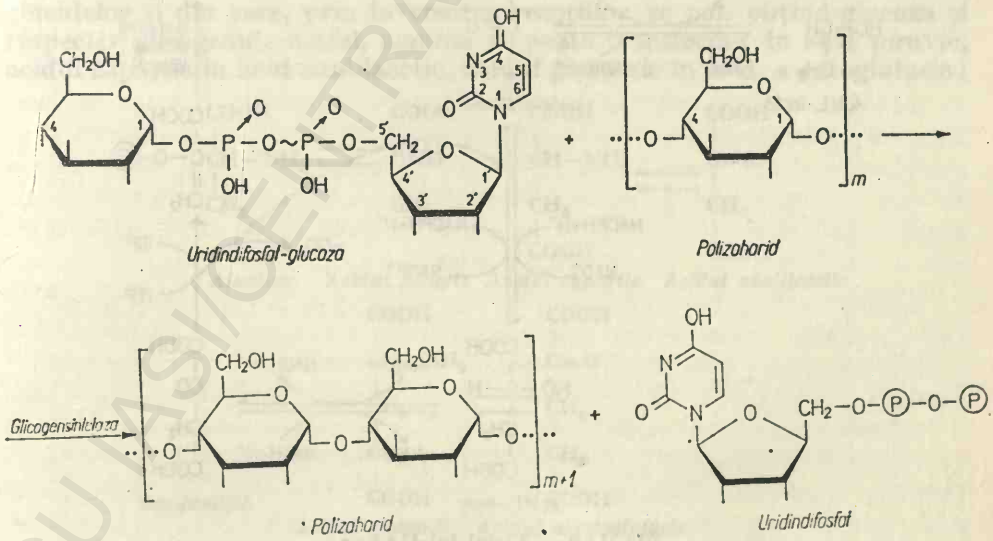
Transglucozilarea se poate realiza pe două căi:

— sub influența *fosforilazei*, direct din glucozo-1-fosfat prin procesul invers degradării glicogenului:



Pînă nu de mult acesta era considerat mecanismul sintezei glicogenului în ficat, însă cercetările ulterioare au dovedit că în realitate, concentrația glucozo-1-fosfatului în celule este mult prea mică pentru a participa la o sinteză susținută de glicogen hepatic, corespunzătoare necesităților fiziologice;

— din uridindifosfat-glucoză, obținută din glucozo-1-fosfat și acid uridintrifosforic, sub influența *UDP-glucozotransferazei* și prin transferul restului de glucoză pe o moleculă de polizaharid al cărui grad de policondensare este mic. Reacțiile care au loc sînt următoarele:



Formarea macromoleculei puternic ramificate a glicogenului are loc sub acţiunea enzimei de ramificare „Q", care este activă în momentul cînd catena polizaharidului conţine un număr de opt unităţi de glucoză. Gradul de ramificare depinde de raportul dintre activităţile catalitice ale glicogen sintetazei şi enzimei „Q".

Glicogenoneogeneza hepatică. Acest proces este realizat în hepatocite şi el are pentru organism o semnificaţie deosebită, deoarece creează, pe de o parte, posibilitatea realizării sintezei zaharurilor din lipide sau din proteine atunci cînd alimentaţia este deficitară în polizaharide, iar pe de altă parte, el conduce la o economie de zaharuri datorită posibilităţii resintetizării acestora din acidul lactic format în ţesutul muscular în cursul degradării anaerobe a glucidelor.

Glicogenoneogeneza din acid lactic. Sinteza glicogenului din acid lactic este un proces endergonic, ce are loc numai în condiţiile oxidării totale a unei părţi din acidul lactic cu eliberarea energiei necesare biosintezei. Acidul lactic format în muşchi prin degradarea anaerobă a glucidelor este transportat de sînge la ficat, unde o cantitate echivalentă cu 1/6 — 1/5 este oxidată cu formare de dioxid de carbon şi apă şi cu eliberarea energiei corespunzătoare iar restul de 5/6 —4/5 se transformă în glucoză. Aceasta va fi ultilizată fie pentru reaprovizionarea ţesutului muscular cu glucoză, fie pentru biosinteza hepatică a glicogenului.

Oxidarea unei părţi din acidul lactic (aproximativ 15 %), însoţită de resinteza glicogenului din acid lactic (aproximativ 85 %), este cunoscută ub denumirea de reacţia Pasteur-Meyerhoff şi este prezentată. schematic, în fig. 14.7. Intensitatea cu care decurge acest proces este estimată prin mărirea coeficientului de oxidare a cărui valoare este dată de raportul acid lactic/acid lactic oxidat.

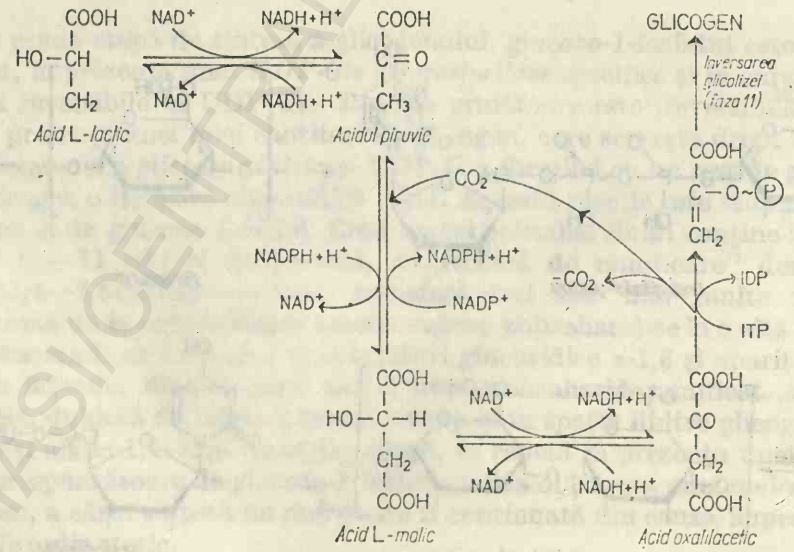


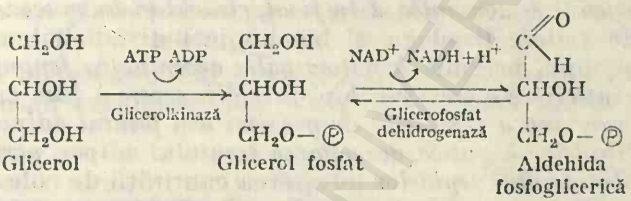
Fig. 14.9. — Ciclul lui Utter.

În cazul în care travaliul muscular necesită mari cantităţi de glucoză, aceasta este vehiculată de sînge de la ficat la mușchi, unde nu se mai transformă în glicogen muscular și este oxidată imediat la acid lactic.

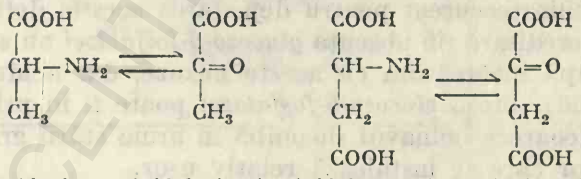
Mecanismul transformării acidului lactic în glicogen reprezintă în mare parte inversarea reacţiilor de degradare oxidativă a glucidelor.

Cercetările recente ale lui U t t e r au arătat că trecerea barierelor energetice care stau în calea reacţiei endergonice acid piruvic→acid fosfoenolpiruvic, necesitînd mari cantităţi de ATP, poate fi parţial ocolită pe calea intermediară a formării acidului oxalilacetic, care necesită un aport mai mic de energie. Această cale cunoscută sub denumirea de *ciclul lui* U t t e r, porneşte de la acidul piruvic care prin carboxilare reductivă, sub influenţa *malat dehidrogenazei decarboxilantă* trece în acid malic; acesta este dehidrogenat sub acţiunea *malat dehidrogenazei*, iar acidul oxalilacetic este decarboxilat și apoi transformat în acid fosfoenolpiruvic, cu ajutorul acidului inozintrifosforic, ITP (fig. 14.9).

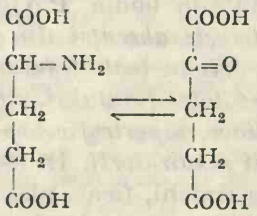
Glicogenoneogeneza din lipide. Biogeneza glicogenului din lipide se bazează pe posibilitatea oxidării glicerinei (rezultată din hidroliza lipidelor) la aldehidă fosfoglicerică, din care se poate sintetiza cu ușurinţă glucoza și apoi glicogenul, pe calea inversă glicolizei.



Glicogenoneogeneza din protide. Protidele pot constitui și ele o sursă pentru biosinteza glucozei în ţesutul hepatic, respectiv a glicogenului. Prin degradarea proteinelor se formează aminoacizi glucoformatori: glicina, alanina, acidul aspartic, acidul glutamic, ornitina etc. Aceşti acizi pot fi transformaţi în cetoacizi care fac parte din ciclul de degradare oxidativă a glucidelor și din care, prin inversarea reacţiilor se pot obţine glucoza și respectiv glicogenul. Astfel, alanina se poate transforma în acid piruvic, acidul aspartic în acid oxalilacetic, acidul glutamic în acid α-cetoglutaric:



Alanina *Acidul piruvic* *Acidul aspartic* *Acidul oxalilacetic*



Acidul glutamic *Acidul α-cetoglutaric*

Glicogenoneogeneza din protide are o deosebită semnificaţie, deoarece poate completa rezervele glucidice ale organismelor animale şi în cazul unei alimentaţii unilaterale cu protide. Experimente efectuate pe cîini hrăniţi exclusiv cu proteine confirmă transformarea acestor proteine în glucoză şi glicogen. S-a putut stabili şi valoarea glicogenetică a proteinelor, constatîndu-se că din 100 g proteine se formează aproximativ 58 g glucoză.

14.1.4.3 Dereglări ale metabolismului glicogenului

Deficienţa glucozo-6-fosfatazei sau boala von Gierke este un *defect enzimatic* explicabil prin perioade severe şi prelungite de hipoglicemie. Enzima prezentă în mod normal în cantităţi importante în ficat, rinichi şi mucoasa intestinală hidrolizează glucozo-6-fosfatul cu formare de glucoză, constituind astfel un important mecanism de reglare a glicemiei. În absenţa *glucozo-6-fosfatazei* se produce hipoglicemia, iar sintezele de glicogen şi acid lactic sînt mult crescute; *hiperlactacidemia este atît de accentuată încît serul capătă un aspect lăptos*; se observă, de asemenea, o gliconeogeneză mult mai activă şi din alţi precursori, de exemplu, din aminoacizi şi drept rezultat *glicogenul se acumulează în ficat, rinichi şi în mucoasa intestinală.* Din punct de vedere fiziologic şi biochimic indivizii bolnavi, de regulă noi-născuţi şi copii, prezintă *hepatomegalie accentuată, fenomene de înapoiere mintală, întîrziere a creşterii, hipoglicemii severe à jeun* care determină o *mobilizare excesivă a rezervelor de grăsimi din ţesutul adipos şi o sinteză accelerată a lipidelor hepatice, dezvoltarea ţesutului adipos, perturbări secundare ale metabolismului lipidelor* (creşterea cantităţii de colesterol sanguin şi depunerea acestuia în piele, sporirea concentraţiei trigliceridelor în plasmă, apariţia stărilor de acidoză ca urmare a unui exces de acizi graşi şi a formării corpilor cetonici din cauza incapacităţii hepatocitului de a oxida excesul de acetil-CoA şi a prezenţei unei cantităţi mai mari de acid lactic în sînge). Boala întîlnită la copii este în cele mai multe cazuri fatală, iar supravieţuirea este însoţită şi de apariţia altor dereglări metabolice (guta, ca urmare a creşterii concentraţiei acidului uric în sînge şi excreţiei scăzute a acestuia pe cale renală). Testele de toleranţă pentru fructoză şi/sau galactoză sînt utilizate curent pentru depistarea acestei deficienţe enzimatice, care este ereditară (în absenţa *glucozo-6-fosfatazei* nu se observă o hiperglicemie după încărcătura cu aceste hexoze, dar acidul lactic creşte extrem de rapid). Lipsa *glucozo-6-fosfatazei* poate fi în primii trei ani de viaţă fatală, deoarece bolnavul sucombă în urma stării grave de acidoză sau a infecţiilor care se instalează relativ uşor.

Glicogenoză generalizată sau boala Pompe. După cum a arătat Hers (1963) *boala se datoreşte absenţei din lizozomi, a complementului α-1,4-glucozidazei şi acumulării în toate ţesuturile a unor mari cantităţi de glicogen, pînă la 10 % din greutatea ţesutului, ceea ce determină cardiomegalii însoţite de insuficienţe cardiace, hipertrofie hepatică, hipotonie generalizată, hipotonie musculară, infecţii respiratorii.* În mod normal *α-1,4-glucozidaza* posedă o mare activitate în rinichi, ficat, plămîni şi glande suprarenale şi deşi nu este direct implicată în procesele de glicoliză şi/sau de gluconeo-

geneză, lipsa ei determină acumularea glicogenului în cantităţi excesive (pînă la 50 % din cantitatea uscată), nu mai pătrunde în lizozomi şi este deci inaccesibil enzimelor din ciclul glicogenolitic. Glicogenul are o structură chimică normală. Absenţa amilo-α-1,4-glucozidazei în boala lui P o m p e este generalizată, este ereditară şi la noi-născuţi şi la copii mici poate fi fatală.

Limit-dextrinoza *sau deficienţa de amilo-1,6-glucozidaza* a fost descrisă de I l l i n g w o r t h şi C o r i (1956) şi este o boală ereditară care constă în *acumularea în ţesuturi, în special în ficat, a glicogenului parţial hidrolizat pe cale enzimatică,* în molecula căruia ramificaţiile sînt foarte scurte şi reamintesc de dextrină. Acest tip de glicogenoză se caracterizează prin *hepatomegalie,* rezultat al acumulării de glicogen în ţesutul hepatic, o glicogenogeneză normală din alte hexoze, decît glucoza şi din aminoacizi, prin lipsa unei acidoze provocate de acumularea de acid lactic. În leucocite, eritrocite, muşchi, miocard şi alte ţesuturi se pot doza cantităţi însemnate de limit-dextrine (H e r s, 1964; H o o f şi H e r s, 1967).

B r o w n şi I l l i n g w o r t h (1962) au demonstrat că „enzima deramificantă" este constituită din două enzime intim asociate:

— o amilo-1,6-glucozidază care este adevărata enzimă deramificantă şi
— de o transferază, a căror activitate poate fi determinată separat.

Dereglările metabolismului glicogenului sînt redate schematic, cu menţionarea factorilor enzimatici care le condiţionează, în figura 14.10.

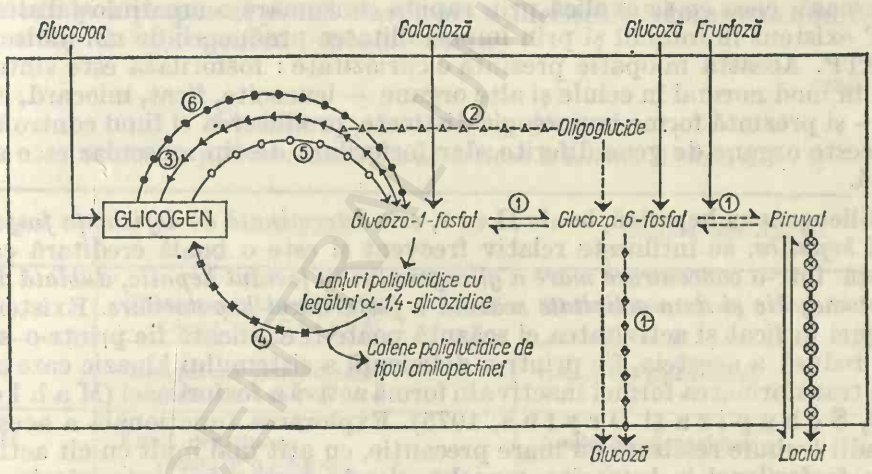


Fig. 14.10. — Dereglări ale metabolismului glicogenului. ①—◇—◇→ Deficienţa glucozo-6-fosfatazei şi explicaţia stării de hipoglicemie; ②—△—△→ Absenţa apoenzimei α-1,4—glucozidazei din lizozomi determină apariţia glicogenolizei generalizate; ③—▲—▲→ Deficienţa amilo-1,6-glucozidazei şi dezvoltarea stării de limit-dextrinoză; ④—▩—▩→ Deficienţa „enzimei de ramificare" amilo-1,4→1,6-transglucozidazei este cauza bolii lui A n d e r s e n; ⑤—○—○→ Deficienţa fosforilazei musculare în maladia M c A r d l e; ⑥—●—●→ Deficienţa fosforilazei hepatice (activitatea fosforilazei musculare este normală). În partea superioară a schemei se indică glucidele folosite pentru încărcătura cu glucide (galactoza şi fructoza), glucoza administrată în ⑤ pentru menţinerea nivelului glicemiei şi acţiunea glucagonului utilizat în testele clinice pentru diferenţierea diagnosticului. În partea de jos — produsele rezultate prin metabolizarea normală a glicogenului şi eliminate în singe.

Amilopectinoza sau boala Andersen se caracterizează prin *hepatosplenomegalie, hipertensiune portală, hepatită, ascite și insuficiență hepatică* care pot duce la un sfîrșit fatal. Din punct de vedere biochimic amilopectinoza constă în depozitarea în țesutul hepatic a glicogenului cu o structură anormală, mult mai solubil în apă decît glicogenul normal, cu catene alcătuite din unități glicozidice unite α-1,4 și de aproximativ două ori mai lungi decît în mod normal, extrem de puțin ramificate, reamintind astfel amilopectina. Aceste molecule anormale de glicogen se depozitează în ficat, țesutul muscular neted și striat, inimă, celule reticulo-endoteliale, tubulii renali etc. și este hidrolizat de fosforilază în proporție de 50% (Illingworth și Cori, 1956). Maladia se datorește deficienței de amilo-1,4→1,6-transglicozidază din ficat. Pe de altă parte Brown și Illingworth (1956) presupun că această maladie este condiționată de deficiența a două enzime „de ramificare" diferite, fiecare din acestea avînd o specificitate proprie față de lungimea catenei-donor și acționînd ca și „enzima deramificantă" care, de asemenea, este constituită din două entități structurale sau funcționale.

Boala McArdles sau deficiența fosforilazei musculare constă în *acumularea glicogenului exclusiv în țesutul muscular* — în *sarcolemă și în miofibrile* — datorită faptului că în absența fosforilazei prima etapă a glicogenolizei, hidroliza legăturilor α-1,4 din glicogen, este blocată și nu se mai formează glucozo-1-fosfat. Din această cauză mușchiul nu se mai poate contracta decît de cîteva ori, după care relaxarea lui devine lentă și dureroasă, ceea ce se explică prin rapida consumare a creatinfosfatului și ATP existent în mușchi și prin imposibilitatea producerii de noi molecule de ATP. Această miopatie prezintă o curiozitate : fosforilaza este sintetizată în mod normal în celule și alte organe — leucocite, ficat, miocard, creier — și prezintă forme imunologic distincte, producerea ei fiind controlată în aceste organe de gene diferite, dar fosforilaza de tip muscular este absentă.

Glicogenoza hepatică, boala Hers, *este determinată de deficiența fosforilazei hepatice,* se întîlnește relativ frecvent și este o boală ereditară care constă într-o *concentrare mare a glicogenului în țesutul hepatic, dublată de o hepatomegalie și de o activitate scăzută a fosforilazei hepatocitare.* Existența enzimei în ficat și activitatea ei scăzută poate fi explicată fie printr-o sinteză redusă a acesteia, fie printr-o deficiență a sistemului kinazic care asigură transformarea formei inactive în formă activă a fosforilazei (Mahler, 1970, Schapira și Dryfus, 1975). Explorarea funcțională a acestei maladii trebuie realizată cu mare precauție, cu atît mai mult cu cît activitatea fosforilazei în leucocite, mușchi, glande suprarenale etc. rămîne în limite normale.

Deficiența fosfofructokinazei musculare sau glicogenoza de tip VII a fost depistată în unele mioglobinopatii în care această enzimă este total absentă și glicogenul se acumulează în țesutul muscular. Fosfofructokinaza este o enzimă cheie în procesul glicolitic, ea constituind unul din factorii limitanți, îndeosebi în hematii. Absența enzimei din mușchi este însoțită de mioglobinurii severe, oboseală, dureri musculare după efort fizic și dependența totală a activității musculare de producerea de energie pe seama glicolizei. În mușchi cantitățile de glicogen, glucozo-1-fosfat și

fructozo-1-fosfat sînt mult mai mari decît în mod normal, în schimb fructozo-1,6-difosfatul şi acidul piruvic sînt mult diminuate, ceea ce indică absenţa fosfofructokinazei musculare sau o activitate extrem de mică (aprox. 1—2 % din activitatea normală).

Layzer şi colab. şi Dryfus şi alţii (1975) au folosit antiseruri specifice şi au evidenţiat trei tipuri diferite de fosfofructokinază :

— tipul muscular ;

— tipul prezent în leucocite şi în plachetele sanguine ;

— tipul intermediar prezent în hematii, ficat şi placentă, care sînt condiţionate genetic şi se deosebesc prin inhibiţia sau rezistenţa lor faţă de antiserurile respective. Tipul de fosfofructokinază prezent în hematii este alcătuit din două subunităţi — una de tip muscular şi alta de un tip diferit — ceea ce explică prezenţa unei activităţi enzimatice în hematii în acest tip de glicogenoză.

Deficienţa glicogen sintetazei a fost descrisă de Lewis şi alţii (1962) şi conduce la un *nivel scăzut al glicogenului în ficat şi în muşchi, la apariţia stărilor de hipoglicemie şi a unor dereglări de ordin secundar* (înapoiere mintală, depunerea grăsimilor în ficat, cetonemie etc.).

Lipsa unei enzime participante la procesul de glicogenoliză este însoţită în majoritatea cazurilor de acumularea de glicogen şi numai în cazuri singulare de o diminuare a cantităţii de glicogen tisular. Procesul acumulării glicogenului poartă denumirea de *glicogenoză* şi a fost descris pentru prima dată de Cori în anul 1956 care a demonstrat mecanismul acestei maladii şi a propus şi prima clasificare a diferitelor leziuni biochimice şi a tipurilor de glicogenoză (tabelul 14.1).

TABELUL 14.1

Clasificarea tipurilor de glicogenoze; denumirea şi codul enzimelor a căror lipsă le determină (după Cori)

Tipul	*Denumirea*	*Enzima care lipseşte*
I	Glicogenoză hepato-renală *(boala von Gierke)*	Glucozo-6-fosfataza
II	Glicogenoză generalizată *(boala Pompe)*	Amilo-1,4-glucozidaza
III	Limit dextrinoza *(boala Forbes)*	Amilo-1,6-glucozidaza
IV	Amilopectinoză	Amilo-1,4→1,6-transferaza
V	Glicogenoză musculară *(boala Mac Ardle)*	Fosforilaza musculară
VI	Glicogenoză hepatică *(boala Hers)*	Fosforilaza hepatică
VII	Glicogenoză musculară	Fosfofructokinaza
VIII	Glicogenoză hepatică	Fosforilaza-kinaza

14.1.4.4 Biosinteza celulozei și pectinei

La plante și la microorganisme peretele celular este alcătuit din cantități apreciabile de polizaharide, în special, din *celuloză*, *pectină* și *hemiceluloză*.

Biosinteza celulozei. Studiile efectuate pe algele verzi au evidențiat faptul că biosinteza celulozei este precedată de biosinteza glucoproteinelor. P o n t L e z i c a (1979) generalizînd rezultatele experimentale acumulate presupune că biosinteza celulozei are loc prin intermediul reacțiilor redate schematic în figura 14.11. Dolicololigozaharidul format din resturi de glucoză, provenite din UDP-Glc, unite între ele prin legături glicozidice β-1→ →4 este sintetizat în *reticulul endoplasmic neted* unde sînt localizate glicoziltransferazele participante la biosinteza lipid-oligozaharidului. Ulterior, oligozaharidul este transferat pe o componentă de natură proteică cu formarea unui proteoglican. Această reacție de transfer este inhibată de *cumarină*, inhibitor bine cunoscut al biosintezei celulozei. Proteoglicanul rezultat este ulterior transformat prin adăugarea de noi resturi de glucoză din UDP-Glc în celuloză. Biosinteza polimerilor insolubili în soluții alca-

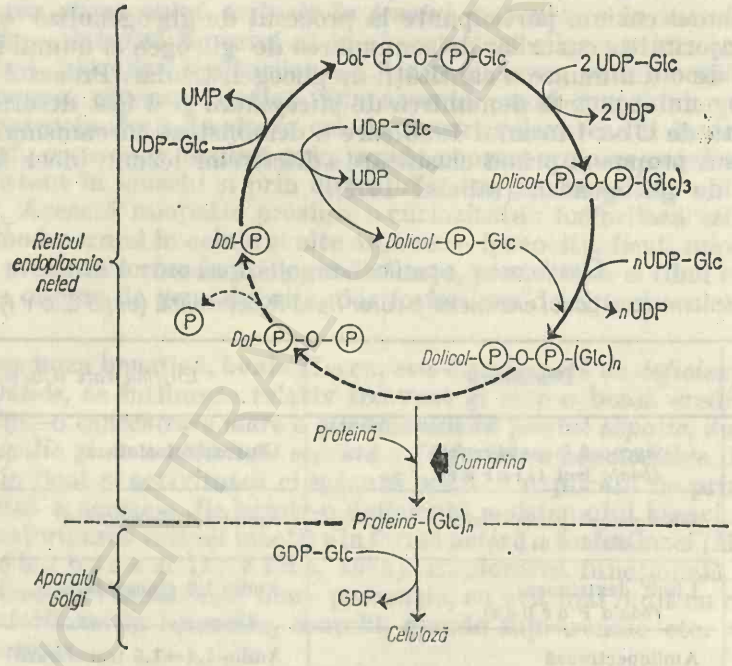


Fig. 14.11. — Schema propusă pentru reacțiile de biosinteză ale precursorilor celulozei (după P o n t L e z i c a, 1979).

line are ca sediu de definitivare *aparatul* G o l g i. Aceste experiențe au fost confirmate în cazul plantulelor de mazăre și de fasole.

Biosinteza pectinei. Pectina este un polizaharid de natură necelulozică și a fost considerată timp îndelungat ca fiind alcătuită numai din resturi, de *acid galacturonic* unite între ele prin legături glicozidice de tipul 1→4.

S-a dovedit însă că din molecula de pectină fac parte și resturi ale altor zaharuri, ca de exemplu cazul acizilor pectinici. Grupările carboxil ale acidului galacturonic pot fi eterificate cu CH_3, provenit din S-adenozilmetionină, formîndu-se astfel pectine care prin hidroliză trec din nou în *acid pectinic*. Majoritatea acizilor pectinici se găsesc în peretele celular sub formă de săruri de calciu denumite *pectinați*, care conferă o anumită rigiditate peretelui celular (fig. 14.12).

14.1.4.5 Biosinteza glicanilor la mamifere

Studiile întreprinse de Leloir și colaboratorii săi privind rolul UDP-glucozei în sinteza polizaharidelor au condus treptat la observația că în preparatele microzomiale ale ficatului de șobolan sînt prezente mono- și oligozaharide legate de o componentă de natură lipidică. În 1972, Behrens și Leloir stabilesc că acest acceptor lipidic al monozaharidelor este dolicolmonofosfatul care formează cu acestea o legătură de tip α-glicozidic. Experiențele ulterioare (Behrens și alții, 1971, Parodi și alții, 1972, *a*, *b*) au confirmat definitiv rolul dolicolmonofosfatului în biosinteza și transferul oligozaharidelor pe proteinele endogene prezente în preparatele microzomiale hepatice.

Școala lui Leloir (v. Parodi, 1972, *b*) a elaborat schema conform căreia sinteza glicanilor hepatici are loc astfel:

$$\text{Dolicol-Ⓟ} + \text{UDP-Glc} \longrightarrow \underset{\searrow \text{UDP}}{\text{Dolicol-Ⓟ-Glc}}$$

Dolicolfosfatglucozilul astfel format poate transfera restul glucozil unui polizaharid legat printr-o legătură pirofosforică cu o moleculă de dolicol. În cursul acestei reacții, catena polizaharidului crește, probabil treptat, iar dolicolmonofosfatul eliberat participă la noi reacții de transfer a restului glucozil:

$$\text{Dolicol-Ⓟ-Glc} + \text{Dolicol-Ⓟ-O-Ⓟ-(glucozil)}_n \longrightarrow$$

$$\text{Dolicol-Ⓟ} + \text{Dolicol-Ⓟ-O-Ⓟ-(glucozil)}_n\text{-Glc}$$

Acest oligozaharid legat de dolicol prin intermediul punții pirofosforice este transferat proteinei endogene:

$$\text{Dolicol-Ⓟ-O-Ⓟ-(glucozil)}_n\text{-Glc} + \text{PROTEINA} \longrightarrow$$

$$\text{Dolicol-Ⓟ-O-Ⓟ} + \text{PROTEINA-(glucozil)}_n\text{-Glc}$$

cu formarea unei glicoproteide.

Transferul unităților manozil a fost demonstrat experimental pe preparate de reticul endoplasmatic neted izolat din ficatul de iepure, pe microzomii separați din creier și din ficatul de porc și se realizează cu ajutorul unui compus intermediar denumit *manolipid* în care raportul manoză/fosfor este cuprins între 1 : 1 și 2 : 1 (Caccam, Jackson, Eylar, 1969).

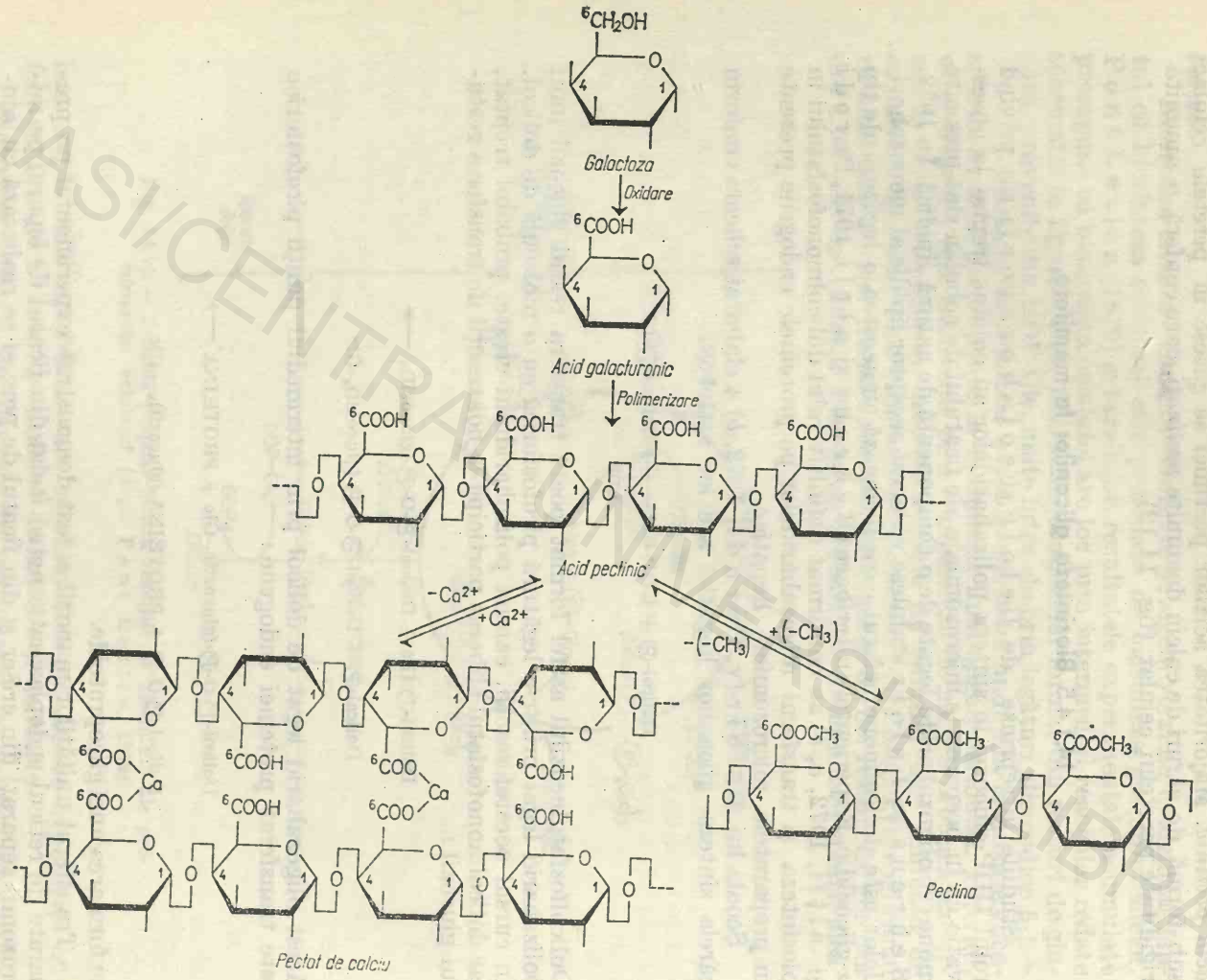


Fig. 14.12. — Schema biosintezei acizilor pectinici, pectinei și pectatului de calciu.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Richards și Hemming (1972) au arătat că dolicolmonofosfatul este transportorul intermediar al resturilor de manoză :

$$\text{GTP} + \text{Manoză} \longrightarrow \text{GDP-Man} + \text{Ⓟ}$$

$$\text{GDP-Man} + \text{Dolicol-Ⓟ} \longrightarrow \text{Dolicol-Ⓟ-Man} + \text{GDP}$$

$$\text{Dolicol-Ⓟ-Man} + \text{PROTEINA} \longrightarrow \text{PROTEINA-Man} + \text{Dolicol-Ⓟ}$$

Experiențele efectuate cu ^{14}C-manoză, dolicol-^{14}C-manoză și dolicolmonofosfat-^{14}C-manoză au confirmat succesiunea acestor reacții în preparatele microzomiale obținute din ficatul de porc. Behrens și alții (1971) au semnalat faptul că adăugarea de dolicolmonofosfat în aceste preparate

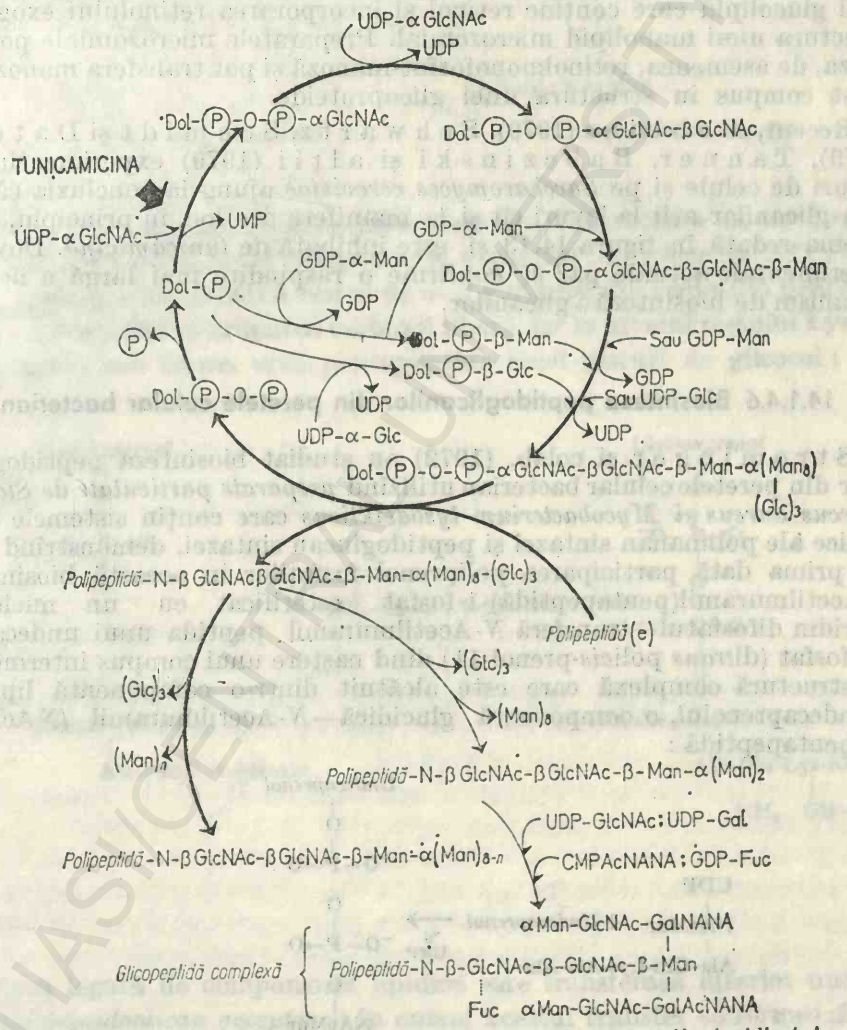


Fig. 14.13. — Biosinteza glicopeptidelor și glicanilor cu un conținut ridicat în manoză (după Robbins, 1979; Schwartz și alții, 1979).

stimulează formarea manolipidului intermediar cu o viteză de zece ori mai mare decît în lipsa lui, fapt care se reflectă și asupra biosintezei glucolipidelor. Manolipidele și manoproteidele sînt sintetizate în membrana mitocondrială (B o s m a n n și a l ț i i, 1969, *a*, *b*).

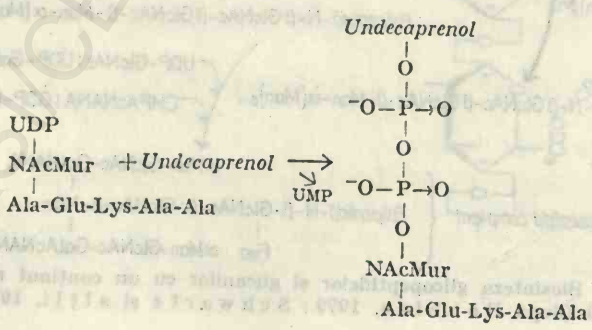
Transferul resturilor de *N*-acetilglucozaminil este realizat tot prin intermediul dolicolmonofosfatului care joacă rolul de purtător sau de acceptor al resturilor *N*-acetilglucozaminil (B e h r e n s și a l ț i i, 1971) provenite din UDP-*N*-acetilglucozamină. Acceptorul de natură proteică care se transformă ulterior într-o glicoproteidă nu se cunoaște încă.

În biosinteza mucopolizaharidelor rolul de transportor intermediar al unităților glucozil, galactozil și manozil îl îndeplinesc derivații fosforilați ai retinolului. D e L u c a și a l ț i i (1970 *a*,*b*, 1972) au identificat în preparatele microzomiale hepatice ale șobolanilor cu retinol-deficiență formarea unui glucolipid care conține retinol și incorporarea retinolului exogen în structura unui manolipid microzomial. Preparatele microzomiale pot sintetiza, de asemenea, retinolmonofosfat-manoză și pot transfera manoza din acest compus în structura unei glicoproteide.

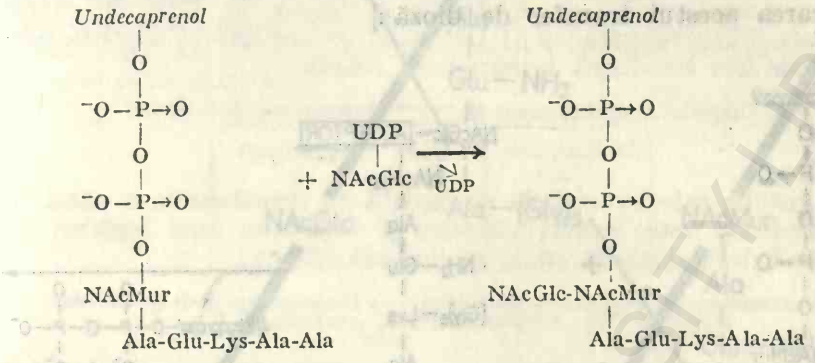
Recent, R o b b i n s (1979), S c h w a r t z, S c h m i d t și D a t e m a (1979), T a n n e r, B a b c z i n s k i și a l ț i i (1979) experimentînd pe culturi de celule și pe *Saccharomyces cerevisiae* ajung la concluzia că sinteza glicanilor atît la levuri cît și la mamifere are loc, în principiu, după schema redată în figura 14.13 și este inhibată de *tunicamicină*. Dovezile experimentale actuale par să confirme o răspîndire mai largă a acestui mecanism de biosinteză a glicanilor.

14.1.4.6 Biosinteza peptidoglicanilor din peretele celular bacterian

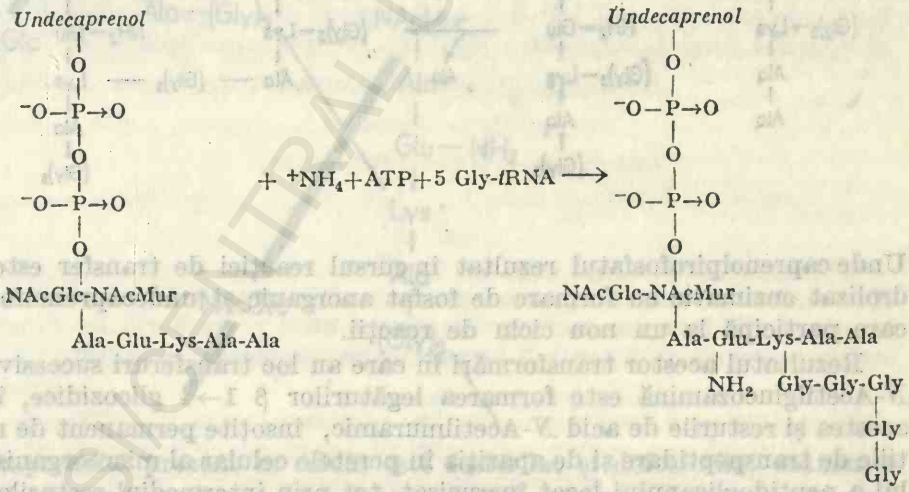
S t r o m i n g e r și colab. (1972) au studiat biosinteza peptidoglicanilor din peretele celular bacterian utilizînd *preparate particulate de Staphylococcus aureus și Mycobacterium lysodeikticus* care conțin sistemele enzimatice ale polimanan sintazei și peptidoglucan sintazei, demonstrînd pentru prima dată participarea poliprenol fosfaților în această biosinteză. *N*-Acetilmuramil(pentapeptidă)-1-fosfat esterificat cu un nucleotid —uridin difosfatul—transferă *N*-Acetilmuramil peptida unui undecaprenol-fosfat (di*trans* poli*cis*-prenol-11) dînd naștere unui compus intermediar de structură complexă care este alcătuit dintr-o componentă lipidică —undecaprenolul, o componentă glucidică—*N*-Acetilmuramil (NAcMur) și o pentapeptidă :



Compusul rezultat intră în reacție cu UDP-N-Acetilglucozil (NAcGlc) dînd naștere unei legături glicozidice de tip β 1→4 și unei dioze legate de un rest de undecaprenol fosfat care îndeplinește rolul de „purtător" sau „transportor":

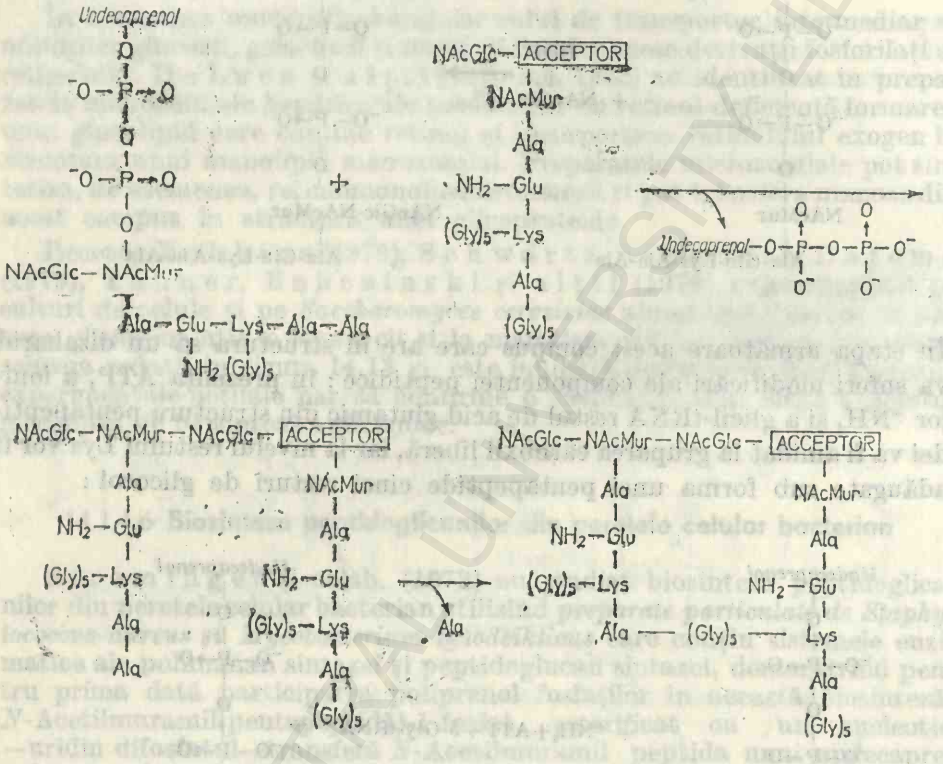


În etapa următoare acest compus care are în structura sa un dizaharid va suferi modificări ale componentei peptidice: în prezența ATP, a ionilor $^{+}NH_4$ și a glicil-*t*RNA restul de acid glutamic din structura pentapeptidei va fi amidat la gruparea carboxil liberă, iar la nivelul restului Lys vor fi adăugate sub forma unei pentapeptide cinci resturi de glicocol:



Dioza legată de componenta lipidică este transferată ulterior unei *molecule peptidoglican acceptor* și în cursul acestui transfer se formează încă o legătură glicozidică de tip 1→4 și se eliberează undecaprenol pirofosfatul.

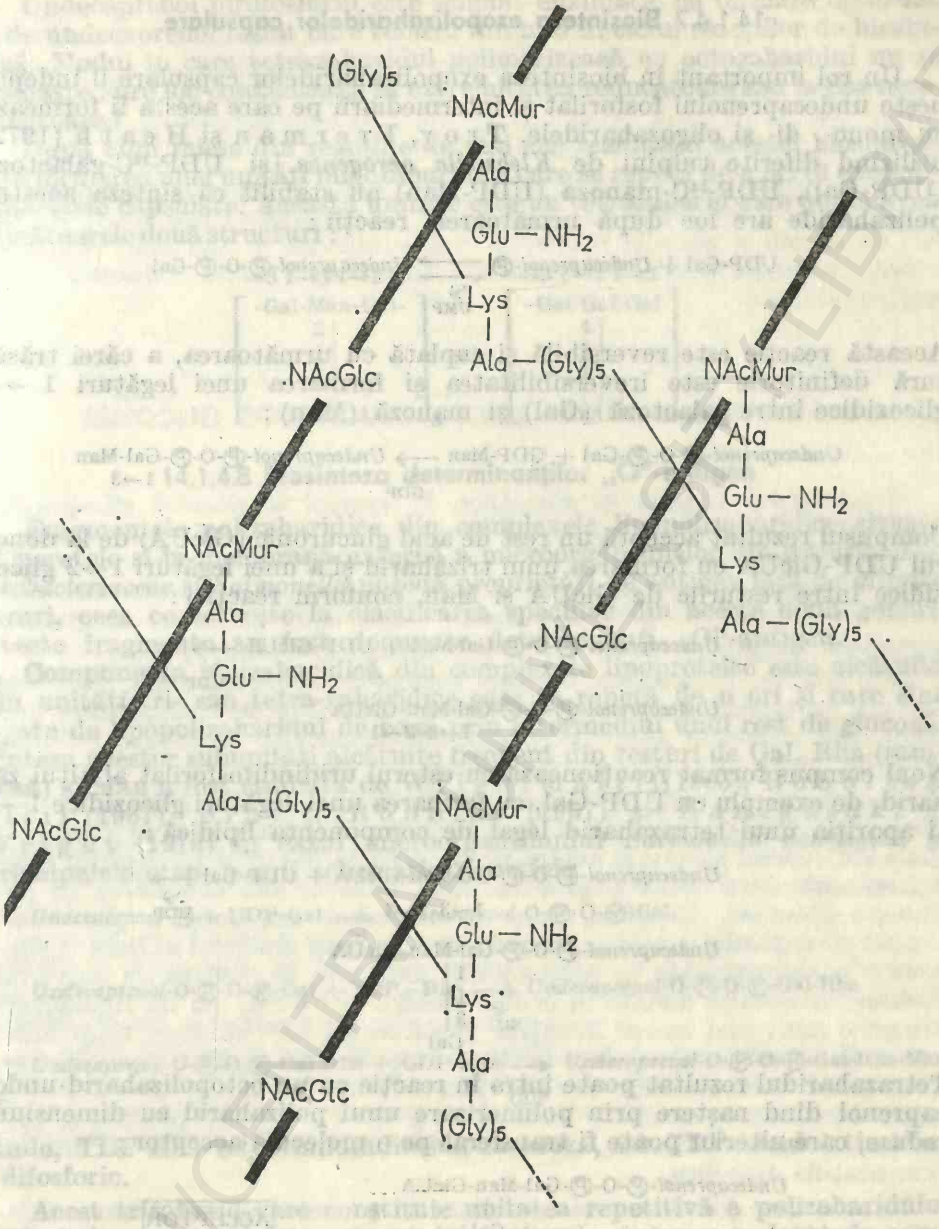
Produsul final al acestei reacţii suferă o reacţie de transpeptidare, între cele două decapeptide, formîndu-se o legătură peptidică şi eliminîndu-se un rest de alanină. Studiile efectuate cu ajutorul compuşilor marcaţi cu izotopi radioactivi ai ^{14}C şi ^{32}P au indicat necesitatea prezenţei UDP-*N*-Acetilglucozaminei şi a intermediarului legat de componenta lipidică pentru realizarea acestui transfer de dioză :



Unde caprenolpirofosfatul rezultat în cursul reacţiei de transfer este hidrolizat enzimatic cu formare de fosfat anorganic şi undecaprenolfosfat, care participă la un nou ciclu de reacţii.

Rezultatul acestor transformări în care au loc transferuri succesive de *N*-Acetilglucozamină este formarea legăturilor β 1→4 glicozidice, între acestea şi resturile de acid *N*-Acetilmuramic, însoţite permanent de reacţiile de transpeptidare şi de apariţia în peretele celular al microorganismului a peptidoglicanului legat încrucişat, tot prin intermediul resturilor de acid *N*-Acetilmuramic cu lanţurile nonapeptidice, în care predomină resturile de glicocol şi alanină.

Structura schematizată, după O s b o r n, a peptidoglicanului din peretele celular al *S. aureus* ar fi următoarea :



Undecaprenolul prezent în celulă este fosforilat și defosforilat enzimatic de fosfokinaze și respectiv de fosfataze și probabil, pe această cale este reglată viteza biosintezei peptidoglicanilor. Antibioticele bacitracina, vancomicina, enduracidina și ristocetina inhibă biosinteza peptidoglicanilor, fie blocînd poliprenol difosfații, fie inhibînd reacția în care este angajat acceptorul (H e m m i n g, 1974; S e c h t e r și a l ț i i, 1972).

14.1.4.7 Biosinteza exopolizaharidelor capsulare

Un rol important în biosinteza exopolizaharidelor capsulare îl îndeplinește undecaprenolul fosforilat și intermediarii pe care acesta îi formează cu mono-, di- și oligozaharidele. T r o y, F r e r m a n și H e a t h (1972) utilizînd diferite tulpini de *Klebsiella aerogenes* [și UDP-^{14}C-galactoza (UDP-Gal), UDP-^{14}C-manoza (UDP-Man) au stabilit că sinteza acestor polizaharide are loc după următoarele reacții :

$$\text{UDP-Gal} + \textit{Undecaprenol-Ⓟ} \rightleftharpoons \textit{Undecaprenol-Ⓟ-O-Ⓟ-Gal} + \text{UMP}$$

Această reacție este reversibilă și cuplată cu următoarea, a cărei trăsătură definitorie este ireversibilitatea și formarea unei legături 1 → 3 glicozidice între galactoză (Gal) și manoză (Man) :

$$\textit{Undecaprenol-Ⓟ-O-Ⓟ-Gal} + \text{GDP-Man} \longrightarrow \underset{1\rightarrow3}{\textit{Undecaprenol-Ⓟ-O-Ⓟ-Gal-Man}} + \text{GDP}$$

Compusul rezultat acceptă un rest de acid glucuronic (GlcUA) de la donorul UDP-GlcUA cu formarea unui trizaharid și a unei legături 1→2 glicozidice între resturile de GlcUA și Man, conform reacției :

$$\textit{Undecaprenol-Ⓟ-O-Ⓟ-Gal-Man} + \text{UDP-GlcUA} \longrightarrow \underset{1\rightarrow3\ 2\rightarrow1}{\textit{Undecaprenol-Ⓟ-O-Ⓟ-Gal-Man-GlcUA}} + \text{UDP}$$

Noul compus format reacționează cu esterul uridindifosforilat al altui zaharid, de exemplu cu UDP-Gal, cu formarea unei legături glicozidice 1→3 și apariția unui tetrazaharid legat de componenta lipidică :

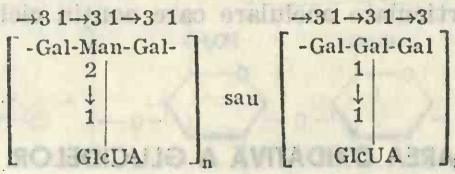
$$\textit{Undecaprenol-Ⓟ-O-Ⓟ-Gal-Man-GlcUA} + \text{UDP-Gal} \longrightarrow \underset{\begin{matrix}1\rightarrow3\ 2\rightarrow1\\ \quad\ \ 1\\ \quad\ \ \downarrow\\ \quad\ \ 3\\ \quad\ \ \text{Gal}\end{matrix}}{\textit{Undecaprenol-Ⓟ-O-Ⓟ-Gal-Man-GlcUA}} + \text{UDP}$$

Tetrazaharidul rezultat poate intra în reacție cu un octopolizaharid-undecaprenol dînd naștere prin polimerizare unui polizaharid cu dimensiuni reduse, care ulterior poate fi transferat pe o moleculă acceptor :

$$\underset{\begin{matrix}\quad\ \ \text{Gal}\\ \quad\ \ |\\ \text{GlcUA}\ \ \text{GlcUA}\end{matrix}}{\textit{Undecaprenol-Ⓟ-O-Ⓟ-Gal-Man-Gal-Gal-Man-Gal-GlcUA}} + \boxed{\text{ACCEPTOR}} \longrightarrow \text{2 } \textit{Undecaprenol-Ⓟ-O-Ⓟ} + \underset{\begin{matrix}\quad\ \ \ \

Undecaprenol pirofosfatul este scindat enzimatic cu formare de fosfat și de undecaprenol fosfat care reintră din nou în ciclul reacțiilor de biosinteză. Modul în care tetrazaharidul polimerizează cu octozaharidul nu se cunoaște : are loc condensarea la extremitatea reducătoare sau la cea nereducătoare ?

După cum reiese din reacțiile de mai sus rezultatul acestei biosinteze este formarea unei unități oligozaharidice care se repetă de *n* ori în exopolizaharidele capsulare. Această unitate este un tetrazaharid care poate avea următoarele două structuri :



14.1.4.8 Biosinteza determinanților „O"-antigen

Fragmentele polizaharidice din complexele lipopolizaharidice situate în peretele și în membrana externă a microorganismelor din genurile *Enterobacteriaceae* și *Salmonella* posedă proprietăți de antigen față de diferite seruri, ceea ce servește la clasificarea speciilor din aceste două genuri. Aceste fragmente au fost denumite determinanți „O"-antigen.

Componenta polizaharidică din complexele lipoproteice este alcătuită din unități tri- sau tetra-zaharidice care se repetă de *n* ori și care sînt legate de lipopolizaharidul de bază prin intermediul unui rest de glucoză. Sinteza acestor subunități alcătuite frecvent din resturi de Gal, Rha (ramnoză) și Man a fost studiată de Wright și alții (1965), Robbins și alții (1967), Bray și Robbins (1967) și Kanegasaki și Wright (1970) în cazul microorganismului *Salmonella newington* și principalele etape pot fi schematizate astfel :

Undecaprenol-Ⓟ + UDP-Gal ⟶ *Undecaprenol*-O-Ⓟ-O-Ⓟ-Gal (UMP)

Undecaprenol-O-Ⓟ-O-Ⓟ-Gal + TDP—Rha ⟶ *Undecaprenol*-O-Ⓟ-O-Ⓟ-Gal-Rha (TDP)

Undecaprenol-O-Ⓟ-O-Ⓟ-Gal-Rha + GDP-Man ⟶ *Undecaprenol*-O-Ⓟ-O-Ⓟ-Gal-Rha-Man (GDP)

unde, TDP-Rha este timidindifosfat-ramnoza, iar TDP- acidul timidin-difosforic.

Acest trizaharid care constituie unitatea repetitivă a polizaharidului întîlnit în structura determinantului antigenic și care este legat de componenta de natură lipidică, polimerizează cu altă unitate trizaharidică legată de undecaprenol-pirofosfat cu formarea unei legături glicozidice între resturile de Gal și Man, din cele două trizaharide :

Undecaprenol-O-Ⓟ-O-Ⓟ-Gal-Rha-Man + *Undecaprenol*-O-Ⓟ-O-Ⓟ-Gal-Rha-Man →

Undecaprenol-O-Ⓟ-O-Ⓟ + *Undecaprenol*-O-Ⓟ-O-Ⓟ-Gal-Rha-Man-Gal-Rha-Man

sintetizîndu-se un hexazaharid. Bray şi Robbins (1967) şi Kanegasaki şi Wright (1970) au arătat că în momentul în care lungimea catenei polizaharidice atinge dimensiunile necesare aceasta este transferată cu ajutorul intermediarului undecaprenol difosforilat pe o structură lipopolizaharidică de bază, dînd naştere unui lipopolizaharid cu proprietăţi antigenice specifice microorganismului respectiv.

Acest mecanism de biosinteză studiat în cazul numeroaselor specii de *Salmonella (S. newington, S. anatum, S. typhimurium)* precum şi pe culturi de *E. coli* şi *Shigella flexneri* a fost confirmat în linii mari cînd s-au folosit preparate particulate acelulare care conţin ciclul sintetazei „O"-antigenului.

14.2 DEGRADAREA OXIDATIVĂ A GLUCIDELOR. GLICOLIZA

Catabolismul anaerob al glucidelor, în special al glucozei, glicogenului şi amidonului în organism poartă denumirea de glicoliză. Glucoza, care circulă în stare liberă în sînge este preluată de către celulă, în majoritatea cazurilor printr-un mecanism selectiv de transport, şi este fosforilată enzimatic cu formare de glucozo-6-fosfat. Acest ester fosforilat al glucozei reprezintă de fapt forma metabolic activă a glucozei.

Alte hexoze, de exemplu, fructoza care provine din zaharoză, galactoza care are ca origine moleculele de lactoză, manoza şi monozaharidele provenite din glucidele alimentare sînt, de asemenea, degradate oxidativ după transformarea lor corespunzătoare (v. mai departe).

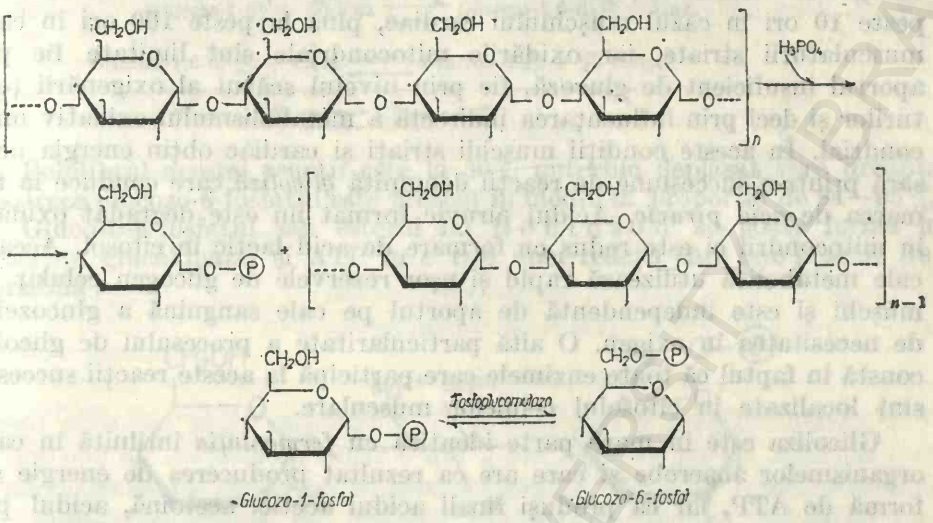
Degradarea glucozei în cadrul procesului de glicoliză are loc în mod diferit în ţesutul muscular şi în alte cîteva ţesuturi animale unde produsele finale sînt acidul piruvic şi acidul lactic decît la drojdiile alimentare unde se formează alcool etilic şi procesul este cunoscut sub denumirea de *fermentaţie alcoolică.* Glicoliza, cale de degradare anaerobă a glucidelor, furnizează o cantitate relativ mică de energie, însă produsul ei final, acidul piruvic poate pătrunde în mitocondrii unde este în continuare degradat oxidativ în condiţii aerobe în cadrul ciclului Krebs, cu un randament energetic mult mai mare. Reacţiile glicolizei au fost studiate timp îndelungat şi actualele cunoştinţe privind etapele intermediare ale glicolizei le datorăm cercetătorilor Cori, Harden, Young, Neuberg, Embden, Meyerhof, Warburg şi Parnas, precum şi predecesorilor lor Pasteur, Liebig şi Buchner, care au studiat fermentaţiile alcoolice.

Hexoza care joacă un rol important în procesul de degradare oxidativă a glucidelor este glucozo-6-fosfatul care se poate forma pe mai multe căi:

— *din glucoză,* prin fosforilare cu ajutorul ATP în prezenţa glucokinazei:

$$\text{Glucoză} \xrightleftharpoons[\text{ADP}]{\text{Glucokinaza; ATP}} \text{Glucozo-6-fosfat};$$

— *din glicogen*, prin degradarea fosforolitică în prezența acidului ortofosforic și a fosforilazei, se formează într-o primă etapă glucozo-1-fosfat, care prin izomerizare în prezența fosfoglucomutazei trece în glucozo-6-fosfat, conform reacțiilor :



Degradarea glucozo-6-fosfatului care se formează poate să se efectueze pe diferite căi metabolice :

— *calea glicolitică sau de degradare anaerobă*, care are loc în țesutul muscular și în alte țesuturi animale și se soldează cu formare de acid piruvic și acid lactic ; atunci cînd degradarea este realizată de diferite microorganisme rezultă diverse tipuri de fermentații și produșii finali sînt în funcție de tipul de fermentație : acidul lactic, acidul butiric, acidul citric, alcoolul etilic ;

— *calea pentozofosfaților* prin care glucozo-6-fosfatul este transformat în pentoze ;

— *calea Entner-Doudoroff* este o cale particulară de transformare a glucozo-6-Ⓟ la unele microorganisme *(Azotobacter, Pseudomonas, Acetobacter)* prin care se formează alcool pe o cale metabolică diferită de cea a fermentației alcoolice comune și

— *calea acizilor uronici*, în care se utilizează de fapt esterul glucozo-1-Ⓟ și se formează acizii uronici utilizați la nivelul celulei fie pentru procesele de biosinteză a mucopolizaharidelor, fie pentru îndepărtarea produselor toxice (detoxifiere celulară).

14.2.1 Calea glicolitică, glicoliza sau calea metabolică Embden-Meyerhof-Parnas

Degradarea anaerobă a glucidelor reprezintă procesul degradării oxidative a acestora fără participarea oxigenului și care are ca rezultat final, în celulele animale, *formarea acidului lactic.* Necesitățile energetice ale celu-

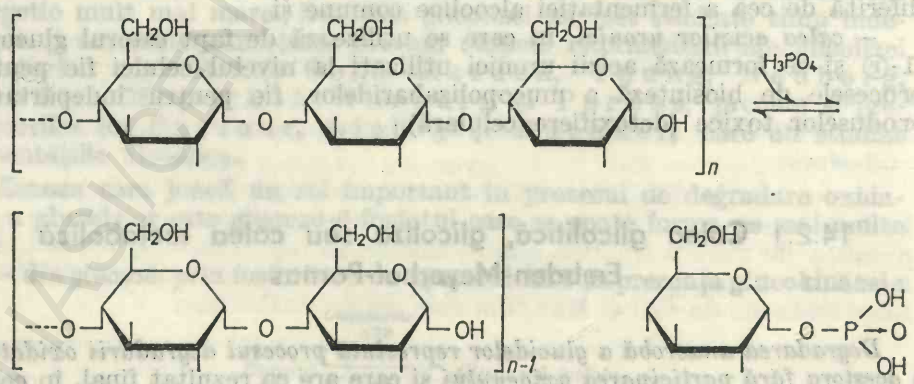
lelor vii sînt, în mod normal, acoperite prin regenerarea permanentă a ATP la nivelul mitocondriilor prin oxidarea NADH + H^+.

În cazul unui efort fizic susținut și îndelungat acoperirea necesităților energetice celulare cu ATP devine problematică, deoarece ele cresc de peste 10 ori în cazul mușchiului cardiac, pînă la peste 100 ori în cazul musculaturii striate, iar oxidările mitocondriale sînt limitate fie prin aportul insuficient de glucoză, fie prin nivelul scăzut al oxigenării țesuturilor și deci prin influențarea indirectă a metabolismului oxidativ mitocondrial. În aceste condiții mușchii striați și cardiac obțin energia necesară printr-o succesiune de reacții denumită *glicoliză* care conduce la formarea de *acid piruvic*. Acidul piruvic format nu este degradat oxidativ în mitocondrii ci este redus cu formare de acid lactic în citosol. Această cale metabolică utilizează rapid și ușor rezervele de glicogen celular din mușchi și este independentă de aportul pe cale sanguină a glucozei și de necesitatea în oxigen. O altă particularitate a procesului de glicoliză constă în faptul că toate enzimele care participă la aceste reacții succesive sînt localizate în citosolul celulelor musculare.

Glicoliza este în mare parte identică cu *fermentația* întîlnită în cazul organismelor anaerobe și care are ca rezultat producerea de energie sub formă de ATP, iar ca produși finali acidul acetic, acetoină, acidul propionic.

În țesutul muscular, cînd procesul de glicoliză începe de la glicogen, au loc următoarele etape:

1. **Prima etapă** constă într-un *proces de fosforoliză a glicogenului în prezența acidului ortofosforic și a fosforilazei.* Se formează un ester al glucozei, glucozo-1-fosfatul, prin scindarea unei legături glicozidice α-1,4 din molecula glicogenului și anume de la extremitatea reducătoare, care posedă gruparea semiacetalică liberă. Legăturile α-1,6-glicozidice nu sînt hidrolizate pe cale fosforolitică ci sub acțiunea enzimei α-1,6-glucanglucanohidrolaza. Fosforoliza glicogenului poate fi reprezentată schematic astfel:



Glucozo-1-fosfat

2. Etapa a doua — *Izomerizarea glucozo-1-fosfatului de către fosfoglucomutază cu formare de glucozo-6-fosfat.* Enzima fosfoglucomutaza are în calitate de coenzimă *glucozo-1,6-difosfatul* și reacția decurge în două etape succesive:

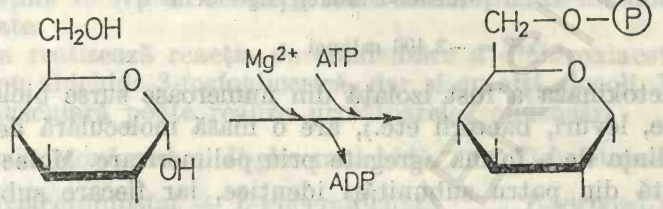
Glucozo-1-Ⓟ + Ⓟ-Enz ⇌ *Glucozo*-1,6-diⓅ + Enz.

Glucozo-1,6-di-Ⓟ + Enz. ⇌ *Glucozo*-6-Ⓟ + Ⓟ-Enz.

Glucozo-1-Ⓟ ⇌ *Glucozo*-6-Ⓟ

Echilibrul acestei reacții este la 30°C puternic deplasat spre dreapta deoarece glucozo-6-fosfatul este prezent în mediu în proporție de 94—95%.

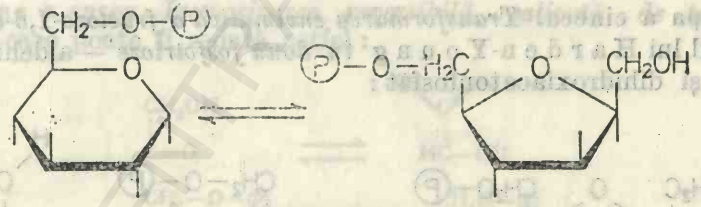
Glucozo-6-fosfatul sau esterul lui Robinson se poate forma în prezența glucokinazei și ATP în cursul unei reacții care este practic ireversibilă:



$$K'_{pH\,7.0} = \frac{[\text{Glucozo-6-fosfat}]\,[Mg^{2+}\cdot ADP^{3-}]}{[\text{Glucoză}]\,[Mg^{2+}-ATP^{4-}]} = 650$$

$\Delta F^\circ = -4\,000$ cal/mol.

3. Etapa a treia. *Izomerizarea esterului glucozo-6-fosfat sub acțiunea fosfoglucozoizomerazei* la *ester fructozo-6-fosfat,* denumit și *ester* Neuberg. Reacția de izomerizare este reversibilă și în stare de echilibru dinamic raportul între formele aldoză/cetoză este de 7 : 3.



Glucozo-6-Ⓟ
Esterul Robinson

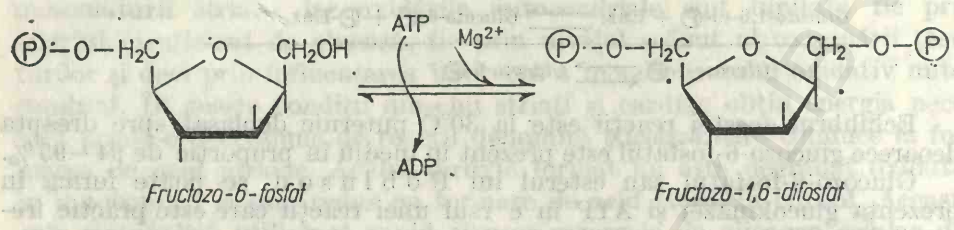
Fructozo-6-Ⓟ
Esterul Neuberg

$$K'_{pH\,7.0} = \frac{[\text{Fructozo-6-fosfat}]}{[\text{Glucozo-6-fosfat}]} = 0{,}5,$$

$\Delta F^\circ = +400$ cal/mol.

Fosfoglucoizomeraza este o enzimă puțin studiată. La om această enzimă este prezentă sub formă de izoenzime constituite din 2 subunități identice.

4. Etapa a patra. *Fosforilarea esterului* Neuberg *cu formarea de fructozo-1,6-difosfat.* Fosforilarea este realizată de enzima *fosfofructokinază*, în prezenţa ATP şi a ionilor de Mg^{2+}. Datorită structurii şi proprietăţilor ei cinetice fosfofructokinaza ocupă o poziţie cheie, fiind o enzimă alosterică. Reacţia este următoarea:

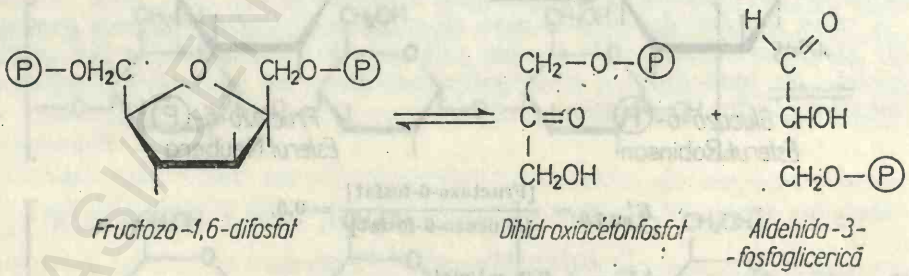


$$K'_{pH\,7} = \frac{[\text{Fructozo-1,6-difosfat}]}{[\text{Fructozo-6-fosfat}]\ [Mg^{2+} \cdot ATP^{4-}]} = 220,$$

$$\Delta F^\circ = -3{,}400 \text{ cal/mol.}$$

Fosfofructokinaza a fost izolată din numeroase surse biologice (ţesuturi animale, levuri, bacterii etc.), are o masă moleculară de 360 000 şi posedă tendinţa de a forma agregate prin polimerizare. Molecula enzimei este alcătuită din patru subunităţi identice, iar fiecare subunitate are un centru catalitic. Concentraţiile mari de ATP, 2,3-difosfoglicerat şi citrat acţionează ca modulatori negativi alosterici reacţionînd cu structurile de inhibiţie ale fosfofructokinazei, în timp ce AMP, ADP, K^+, NH_4^+, fosfatul sînt modulatori alosterici pozitivi. Dintre aceştia cel mai eficace este AMP. Fosfofructokinaza hepatică este sensibilă şi faţă de acizii graşi liberi care au asupra enzimei un efect similar cu cel al concentraţiilor mari de ATP. Enzima izolată din muşchi şi din levuri necesită prezenţa ionilor monovalenţi de K^+ sau de NH_4^+.

5. Etapa a cincea. *Transformarea enzimatică a fructozo-1,6-difosfatului* sau esterul lui Harden-Young *în două fosfotrioze* — aldehida-3-fosfoglicerică şi dihidroxiacetonfosfat:



$$K'_{pH\,7} = \frac{[\text{Aldehida-3-fosfoglicerică}]\ [\text{Dihidroxiacetonfosfat}]}{[\text{Fructozo-1,6-difosfat}]} = 10^{-4},$$

$$\Delta F^\circ = +5\,700 \text{ cal/mol.}$$

Scindarea legăturii covalente dintre atomii C_3 și C_4 ai fructozei este reversibilă și catalizată de enzima *aldolaza* iar echilibrul reacției este puternic deplasat spre stînga, adică spre formarea fructozei din cei doi esteri fosforici ai triozelor. Datorită însă faptului că aldehida-3-fosfoglicerică este rapid transformată, iar prin izomerizare dihidroxiacetonfosfatul este transformat în aldehidă-3-fosfoglicerică, deci este permanent scos din sistem, echilibrul reacției în condiții fiziologice este ușor deplasat în sensul scindării fructozo-1,6-difosfatului.

Aldolaza a fost bine studiată sub cele mai diferite aspecte. Izolată din numeroase surse biologice ea s-a dovedit a fi o enzimă tetrameră, masă moleculară de 160 000. Din țesuturile animale au fost izolate trei aldolaze diferite, specifice pentru diferite țesuturi: muscular, hepatic, nervos (sistemul nervos central). Tipul aldolazei musculare este prezent în primele luni de viață și în ficat, unde este apoi înlocuit treptat cu aldolaza de tip hepatic. Persistența formei foetale de aldolază de tip muscular în ficatul adulților relevă un defect genetic care limitează metabolismul fructozei ingerate.

Aldolaza realizează reacția de condensare a dihidroxiacetonfosfatului nu numai cu aldehida-3-fosfoglicerică, dar și cu alți alcooli. De exemplu, aldolaza musculară poate realiza următoarele condensări:

Dihidroxiacetonfosfat + *D*-gliceraldehidă $\rightleftharpoons$ *D*-fructozo-1-fosfat

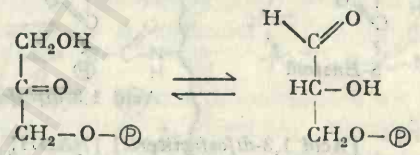
Dihidroxiacetonfosfat + *L*-gliceraldehidă $\rightleftharpoons$ *L*-sorbozo-1-fosfat

Dihidroxiacetonfosfat + Acetaldehidă $\rightleftharpoons$ Metiltetroză-1-fosfat

și manifestă, după cum reiese din reacțiile de mai sus, o specificitate absolută pentru dihidroxiacetonfosfat.

Preparatele de aldolază izolate din levuri și de la numeroase microorganisme necesită, spre deosebire de aldolaza musculară, prezența în calitate de cofactori a Fe^{2+}, CO^{2+} sau Zn^{2+}. Cationul normal al enzimei native pare a fi în cazul acestor aldolaze Zn^{2+}.

6. Etapa a șasea. *Izomerizarea reversibilă realizată de triozofosfatizomerază* care poate fi redată astfel:



Dihidroxiacetonfosfat (96,5 %) *Aldehida-3-fosfoglicerică* (3,5 %)

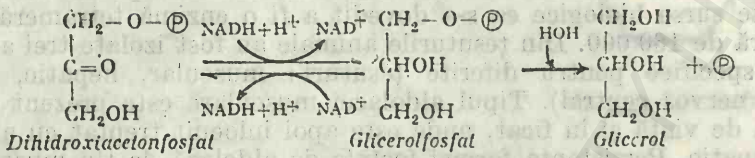
$$\mathcal{K}'_{pH\,7,0} = \frac{[\text{Aldehida-3-fosfoglicerică}]}{[\text{Dihidroxiacetonfosfat}]} = 0{,}075.$$

$$\Delta F^{\circ} = +1{,}500 \text{ cal/mol.}$$

Echilibrul reacției este deplasat în favoarea dihidroxiacetonfosfatului, însă datorită faptului că aldehida-3-fosfoglicerică este consumată în etapa următoare, aceasta se formează permanent din cetoza fosforilată, astfel că în mod practic dihidroxiacetona este permanent antrenată în etapele următoare ale glicolizei.

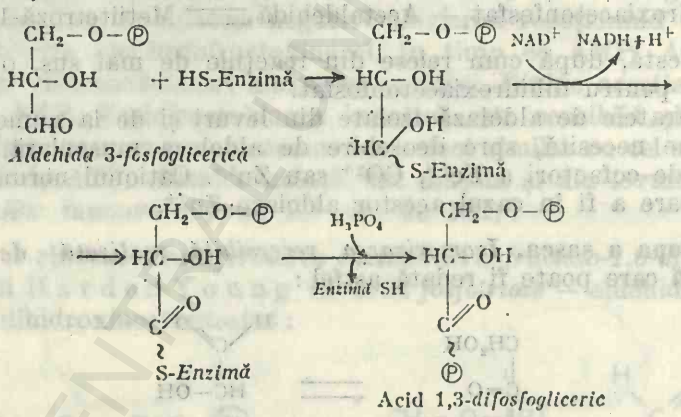
Triozofosfatizomeraza este o enzimă-dimer alcătuită din două subunităţi neidentice, are o masă moleculară de 56 000 şi este specifică pentru forma ceto.

Această etapă a procesului de glicoliză poate fi utilizată în mod dirijat pentru prepararea glicerolului: dihidroxiacetonfosfatul poate fi redus în prezenţa unui donor de echivalenţi reducători, de exemplu a NADH + + H^+, cu formare de glicerolfosfat, care ulterior prin hidroliză eliberează glicerol şi fosfat anorganic. Procesul care poate fi redat schematic astfel:



este catalizat de *3-fosfoglicerol dehidrogenază* (etapa de reducere), masă moleculară de aproximativ 62 000, enzimă care pe lîngă situsul catalitic posedă cîte un situs alosteric pentru cele patru substrate ale reacţiei enzimatice (dihidroxiacetonfosfat, glicerolfosfat, NADH + H^+ şi NAD^+). 3-Fosfoglicerol dehidrogenazele izolate din diferite surse sînt diferite ca structură şi proprietăţi cinetice.

7. Etapa a şaptea. *Fosforilarea oxidativă la nivelul substratului reacţiei enzimatice*, realizată de *gliceraldehid-3-fosfatdehidrogenază.*



$$K'_{pH\ 7,0} = \frac{[Acid\ 1,3\text{-}difosfogliceric]\ [NADH]}{[Aldehida\ 3\text{-}fosfoglicerică]\ [NAD^+]\ [Ⓟ]} = 0,08.$$

$$\Delta F^\circ = +1\ 500\ cal/mol.$$

Gliceraldehid 3-fosfatdehidrogenaza este prezentă în cantităţi relativ mari în celulele şi în ţesuturile în care procesele de degradare anaerobă a glucidelor sînt intense. De exemplu, în ţesutul muscular de iepure sau în levuri, gliceraldehid 3-fosfatdehidrogenaza formează aproximativ între 10 pînă la 20% din totalul proteinelor celulare solubile. Enzima a fost obţinută în stare purificată din numeroase surse animale şi vegetale şi structura ei primară este bine cunoscută. Gliceraldehid 3-fosfatdehidro-

genaza izolată și purificată din mușchiul striat de iepure are o masă moleculară de 140 000 și este un tetramer alcătuit din patru subunități identice și conține două molecule de NAD^+ per tetramer. În această formă enzima este rezistentă atacului enzimelor hidrolitice. Proprietățile enzimei care conține NAD^+ legat la centrul ei activ sînt diferite de cele ale moleculei fără NAD^+. Se presupune că datorită echivalenței structurale dintre cei patru monomeri (protomeri) enzima este prezentă sub forma $\alpha_1\alpha_1$— —$\alpha_2\alpha_2$ — deci a doi dimeri, fiecare avînd o cinetică diferită de legare a NAD^+ (rapidă și lentă). Utilizîndu-se reactivi de alchilare, îndeosebi acid monoiodacetic față de care enzima este deosebit de sensibilă, precum și reactivi bifuncționali, de exemplu, dinitrofluorobenzen s-a demonstrat că resturile de *Cys*-149, *Lys*—183 și *His*—38 se găsesc în centrul activ al enzimei, modificarea lor chimică soldîndu-se cu substanțiale fluctuații ale activității catalitice a enzimei. În figura 14.14 este redat schematic mecanismul probabil al reacțiilor de oxidoreducere catalizate de gliceraldehid 3-fosfatdehidrogenază. Se presupune că enzima leagă în primul rînd forma oxidată a NAD în cursul unei reacții în care grupările SH ale enzimei sînt mascate chimic sau steric; în reacția imediat următoare gruparea aldehidică a substratului formează cu gruparea SH a enzimei o legătură

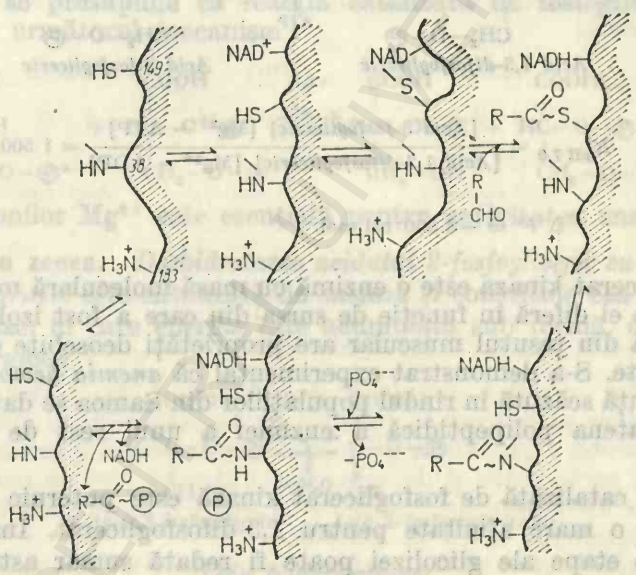


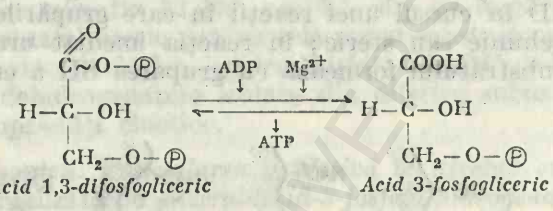
Fig. 14.14.— Mecanismul probabil al acțiunii gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazei cu participarea resturilor a trei aminoacizi *Cys*— 149, *Lys*— 183 și *His*— 38 care se găsesc în centrul activ al enzimei.

tiosemiacetalică și numai după aceea este transferat hidrogenul NAD iar între —SH enzimei și gruparea carboxil a substratului se formează legătura tioesterică. $NADH + H^+$ rezultat în cursul reacției cedează atomul de hidrogen și electronul unei alte molecule de NAD oxidat prezent în citosol și trece din nou în forma NAD^+. Legătura tioesterică a substratului cu enzima este atacată de nucleul imidazolil al restului de *His*-38

cu transferarea acilului şi formare de 3-fosfoglicerol-N-imidazol, care ulterior reacţionează cu fosfatul, gruparea NH_2— a *Lys* intervenind în acest proces, cu formare de acid 1,3-difosfogliceric.

Gliceraldehid 3-fosfatdehidrogenaza oxidează, de asemenea şi *D*- sau *L*-gliceraldehida dar cu viteze mult mai mici. Enzima poate utiliza şi arseniul cu formare de derivaţi care conţin arseniu, de tipul 1-arseno--3-fosfogliceratului.

8. Etapa a opta. *Transferul fosfatului de la acidul 1,3-difosfogliceric la ATP* este realizat pe cale enzimatică de către fosfogliceratkinază. Energia rezultată prin oxidarea aldehidei glicerice cu formarea anhidridei acidului 1,3-difosfogliceric este înmagazinată sub forma energiei de legătură chimică. Simpla hidroliză a acidului 1,3-difosfogliceric este însoţită de o eliberare de —14 800 cal/mol, ceea ce este mult mai mult decît energia necesară transferului grupării fosfat pentru formarea unei molecule de ATP prin esterificarea ADP:



Acid 1,3-difosfogliceric *Acid 3-fosfogliceric*

$$K'_{pH\,7,0} = \frac{[\textit{Acid 3-fosfogliceric}]\ [Mg^{2+} - ATP]}{[\textit{Acid 1,3-difosfogliceric}]\ [Mg^{2+} - ADP]} = 1\,500,$$

$$\Delta F^{\circ} = -4\,500 \text{ cal/mol.}$$

Fosfoglicerat kinaza este o enzimă cu masă moleculară mică (~50 000) şi structura ei diferă în funcţie de sursa din care a fost izolată, de exemplu, enzima din ţesutul muscular are proprietăţi deosebite de cea izolată din eritrocite. S-a demonstrat experimental că *anemia hemolitică* întîlnită cu o frecvenţă scăzută în rîndul populaţiilor din Samoa se datoreşte substituirii în catena polipeptidică a enzimei a unui rest de Asn cu unul de Thr.

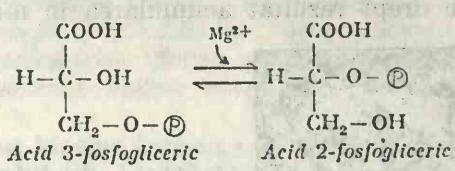
Reacţia catalizată de fosfoglicerat kinază este puternic exe gonică şi enzima are o mare afinitate pentru 1,3-difosfoglicerat. Însumarea ultimelor două etape ale glicolizei poate fi redată sumar astfel:

Aldehida 3-fosfoglicerică + NAD^+ + PO_4^{3-} + ADP $\rightleftharpoons$

Acid 3-fosfogliceric + $NADH + H^+$ + ATP

Dacă se ia în consideraţie faptul că molecula iniţială de glucoză prin glicoliză conduce la formarea a două trioze şi fiecare din acestea sînt transformate în acid 3-fosfogliceric rezultă că în aceste procese (ultimele 2 etape) se formează două molecule de ATP.

9. Etapa a noua. *Transformarea acidului 3-fosfogliceric în acid 2-fosfogliceric* este catalizată de *fosfogliceromutaza*:

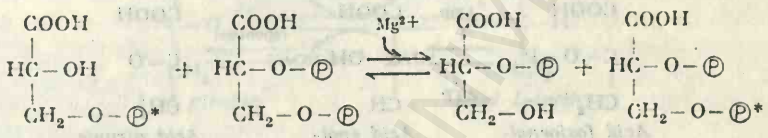


Acid 3-fosfogliceric *Acid 2-fosfogliceric*

$$K'_{pH\,7,0} = \frac{[Acid\ 2\text{-}fosfogliceric]}{[Acid\ 3\text{-}fosfogliceric]} = 0,02.$$

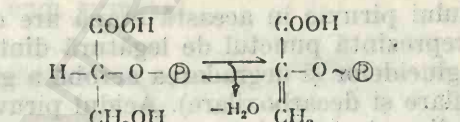
$$\Delta F^{\circ} = +1\,000 \text{ cal/mol.}$$

Fosfogliceromutaza (masă moleculară 65 700) este prezentă în țesuturi sub formă de izoenzime (mușchiul striat al organismelor adulte conține o izoenzimă sensibilă față de Hg^{2+}, în timp ce enzima din mușchiul striat al foetului este insensibilă) și necesită pentru activitatea ei 2,3-difosfoglicerat, în calitate de coenzimă. S-a arătat că un mol de enzimă conține în stare legată doi moli de 2,3-difosfoglicerat. În urma experiențelor realizate cu ^{32}P se presupune că reacția catalizată de fosfogliceromutază decurge după următorul mecanism:



Prezența ionilor Mg^{2+} este esențială pentru activitatea enzimei.

10. Etapa a zecea. *Deshidratarea acidului 2-fosfogliceric cu formare de acid fosfoenolpiruvic* este catalizată de *enolază* și constituie cea de a doua etapă a glicolizei în care energia este acumulată sub formă de legături fosfat macroergice:



Acid 2-fosfogliceric *Acid 2-fosfoenolpiruvic*

$$K'_{pH\,7,0} = \frac{[Acid\ fosfoenolpiruvic]}{[Acid\ 2\text{-}fosfogliceric]} = 0,5.$$

$$\Delta F^{\circ} = +400 \text{ cal/mol.}$$

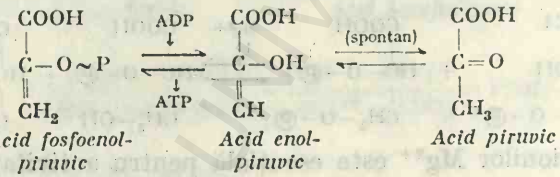
Enolaza care catalizează această reacție a fost izolată și obținută în stare cristalină (fig. 14.15) din diferite surse și are o masă moleculară cuprinsă între 85 000 și 88 000. Enolaza este alcătuită din două subunități identice (la unele specii este prezentă sub formă de izoenzime separabile electroforetic) și cationii bivalenți Mg^{2+} sau Mn^{2+} sînt absolut necesari

pentru ca enzima să formeze complexe enzimă-substrat. Fluorura inhibă activitatea enolazei probabil, pe calea formării fluorofosfatului de magneziu ceea ce are drept rezultat acumularea în mediu a acidului fosfo-

Fig. 14.15. — Enolaza izolată din levuri și cristalizată sub forma sării de mercur (x 300).

gliceric. Procesul enzimatic catalizat de enolază poate fi privit și ca o oxidoreducere intramoleculară, nu numai ca o deshidratare a substratului reacției enzimatice.

11. Etapa a unsprăzecea. *Transferul grupării fosfat de la acidul fosfoenolpiruvic la ADP* este catalizată de *ATP : piruvat fosfotransferaza* sau piruvatkinaza :



Acid fosfoenolpiruvic — *Acid enolpiruvic* — *Acid piruvic*

$$K'_{pH\,7,0} = \frac{[Piruvat]\,[Mg^{2+} - ATP]}{[Fosfoenolpiruvat]\,[Mg^{2+} - ADP]} = 2 \times 10^5,$$

$$\Delta F^\circ = -7{,}500 \text{ cal/mol.}$$

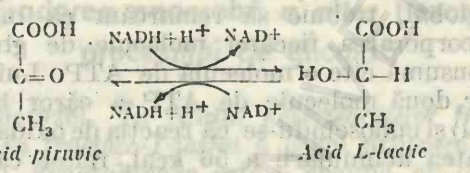
Formarea acidului piruvic în această etapă are o semnificație deosebită, deoarece el reprezintă punctul de legătură dintre glicoliză — degradarea anaerobă a glucidelor și degradarea aerobă a glucidelor (prin mecanismele de carboxilare și decarboxilare). Acidul piruvic realizează și legătura dintre metabolismul glucidelor și metabolismul proteinelor, deoarece prin transaminare trece în alanină.

ATP : piruvat fosfotransferaza sau piruvat kinaza are o masă moleculară de 240 000 și este o enzimă alcătuită din subunități identice multiple, fiind o enzimă reglatoare. La mamifere această enzimă este prezentă sub două forme distincte — forma *L* în ficat și forma *M* în mușchi — a căror comportare cinetică este diferită și urmează regulile aplicabile enzimelor allosterice. Țesutul adipos conține această enzimă sub forma *L*, în timp ce rinichii conțin hibrizi ai ambelor forme *L* și *M*. Forma *M* este prezentă și în ficatul foetului dar ea este înlocuită treptat după naștere prin forma *L*, caracteristică adultului. Enzima izolată din levuri este asemănătoare cu formele *L* de la mamifere. Enzima necesită Mg^{2+} sau Mn^{2+} cu care formează un complex înainte de a reacționa cu substratul,

în timp ce ionii de Ca^{2+} formează cu enzima un complex inactiv, probabil, concurînd cu ceilalți doi cationi bivalenți, Mg^{2+} sau Mn^{2+} și împiedicînd formarea complexului activ. Pentru activitatea ei enzima mai necesită cationi monovalenți de K^+, Rb^+ sau Cs^+. Se presupune că K^+ determină, interacționînd cu enzima, modificări conformaționale, ceea ce produce forme enzimatice mult mai active și că K^+ este activatorul fiziologic al piruvat kinazei.

Activitatea piruvat kinazei hepatice este reglată și prin trei mecanisme suplimentare: este inhibată de acizii grași superiori cu catenă lungă, de acetil SCoA și de succinil SCoA (ultimul este inhibitor numai în prezența fructozo-1,6-difosfatului), de concentrațiile mici de Ca^{2+}.

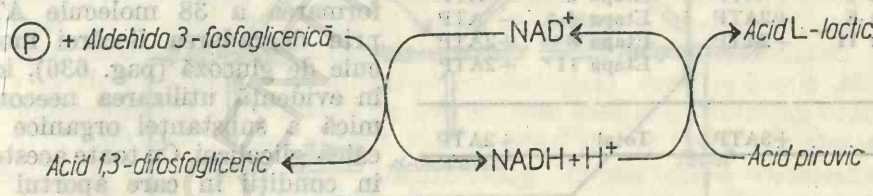
12. Etapa a douăsprezecea. *Reducerea acidului piruvic cu formare de acid lactic* este catalizată de *lactat dehidrogenază* și electronii necesari procesului sînt furnizați de NADH + H^+ rezultat tot în glicoliză în cadrul reacției de oxidare a 3-fosfatgliceraldehidei (etapa a șaptea). Aceste două reacții sînt cuplate, ceea ce asigură desfășurarea normală a glicolizei. Dacă NADH + H^+ nu ar fi reoxidat glicoliza ar fi sistată în momentul în care întreaga cantitate de NAD^+ celular, care este limitată, ar trece sub formă redusă. Reacția catalizată de lactat dehidrogenază poate fi redată astfel:



$$K'_{pH\,7,0} = \frac{[Lactat]\,[NAD^+]}{[Piruvat]\,[NADH]} = 1{,}6 \times 10^4,$$

$$\Delta F'^{\circ} = -6\,000 \text{ cal/mol},$$

iar cuplarea ei cu reacția de oxidare a aldehidei 3-fosfoglicerice poate fi schematizată după cum urmează:



Lactat dehidrogenaza este prezentă în țesuturile mamiferelor cel puțin sub forma a cinci forme moleculare sau izoenzime, care diferă între ele prin gradul de afinitate față de substrat. Enzima este alcătuită din patru subunități identice, fiecare cu o masă moleculară de 35 000 și electroforetic au fost descrise și separate două tipuri de subunități — *H* și *M* — unele abundente în cord (heart), iar altele — în mușchi (muscle). Forma tetrameră H_4 este abundentă în cord, iar forma M_4 în mușchi, în timp ce formele hibride M_3H_1, M_2H_2, M_1H_3 au fost identificate în diferite țesuturi.

Acidul lactic este produsul final al procesului de glicoliză şi el poate difuza prin membrana plasmatică trecînd în sînge şi fiind vehiculat către ficat, unde poate fi parţial oxidat (1/5—1/6 din cantitatea lui) şi energia rezultată utilizată pentru procesul de glicogenoneogeneză din lactat (4/5—5/6). Acumularea acidului lactic în muşchii striaţi în cursul efortului muscular de lungă durată sau a solicitărilor intense de durată scurtă provoacă, parţial, febra musculară şi oboseala datorită acidifierii ţesutului muscular.

Bilanţul energetic al glicolizei arată că în etapa a patra se consumă o moleculă de ATP, iar în etapele 8 şi 11 se acumulează două molecule de ATP. Ţinînd însă seama de faptul că în etapa a cincea o hexoză se transformă în două trioze şi că în continuare toate etapele au ca punct de plecare cele două molecule de trioze, înseamnă că în fazele 8 şi 11, pentru fiecare moleculă de hexoză se cîştigă cîte două molecule de ATP. În cazul în care glicoliza porneşte de la glucoză şi nu de la glicogen, mai intervine o etapă consumatoare de ATP, etapa în care se formează glucozo-6-fosfatul.

Bilanţul energetic final în cele două cazuri este redat în tabelul 14.2.

După cum se vede acumularea de ATP este deci mai mare dacă glicoliza porneşte de la glicogen, decît dacă acest proces are ca punct de plecare glucoza. Acest avantaj este însă numai aparent pentru că, făcînd un bilanţ global, trebuie să remarcăm că în cadrul glicogenogenezei, pentru încorporarea fiecărei molecule de glucoză în molecula glicogenului se consumă cîte o moleculă de ATP. Luîndu-se în considerare formarea celor două molecule de ATP a căror hidroliză eliberează 16 kcal(2×8 000 cal) şi cunoscîndu-se că reacţia de oxidare a glucozei la acid lactic dă posibilitatea acumulării a 56 kcal, reiese că organismul poate valorifica efectiv (sub formă de ATP) energia acestei transformări cu un randament de aproximativ 30%, randament ce poate fi considerat drept eficace. Dacă acest randament se compară cu cel obţinut pe calea degradării aerobe, care duce la formarea a 38 molecule ATP prin degradarea fiecărei molecule de glucoză (pag. 636), iese în evidenţă utilizarea neeconomică a substanţei organice pe calea glicolizei. Cu toate acestea, în condiţii în care aportul de oxigen nu este suficient (de exemplu, în cazul efortului îndelungat şi intens) sau în condiţiile în care acesta lipseşte complet (pentru o scurtă perioadă), organismul, pentru rezolvarea necesităţilor energetice stringente, este obligat să facă apel şi la degradarea anaerobă, neavantajoasă din punct de vedere al bilanţului energetic.

TABELUL 14.2

Bilanţul energetic al procesului de glicoliză

Glicogenoliza		*Glicoliza*	
Etapa 1	— ATP	Etapa 2	— ATP
Etapa 8	+2ATP	Etapa 4	— ATP
Etapa 11	+2ATP	Etapa 8	+2ATP
		Etapa 11	+2ATP
Total	+3ATP	Total	+2ATP

În ceea ce priveşte acidul lactic rezultat în timpul glicolizei, acesta este judicios utilizat de organism, fiind convertit în glicogen prin parcurgerea reacţiilor glicolizei în sens invers. Bineînţeles că acest proces

se realizează numai în prezenţa unui furnizor de energie, capabil să cedeze energia necesară depăşirii barierelor energetice ce stau în calea reacţiilor endergonice, inverse glicolizei. Această resinteză realizabilă doar în ficat (unde acidul lactic e transportat prin intermediul sîngelui), pe calea ciclului lui U t t e r, are loc după ce o parte din acidul lactic a fost oxidat total la CO_2 şi H_2O pentru a se obţine energia necesară glicogenoneogenezei.

S-a constatat că la broască, această resinteză a glicogenului se realizează chiar în muşchi pe seama energiei furnizate prin degradarea completă, cu formare de CO_2 şi H_2O, a circa 20% din acidul lactic rezultat din glicoliză. Prin această oxidare se utilizează şi restul de energie chimică potenţială înmagazinată în molecula iniţială de glucoză, după ce o primă parte a fost utilizată la crearea legăturilor macroergice ale celor două molecule de ATP.

Rostul multiplelor faze, de-a lungul acestei degradări exergonice, este acela de a furniza, treptat, în etape, şi în cantităţi mici, energia care poate fi astfel depozitată, în mod avantajos sub formă de legături macroergice în ATP. Organismul poate utiliza ulterior această energie, pe măsura necesităţilor sale.

14.2.2 Degradarea anaerobă a altor hexoze în cadrul procesului de glicoliză

Degradarea fructozei. *În ficatul nevertebratelor fructoza sub acţiunea fructokinazei trece în fructozo-1-fosfat* a cărui utilizare ulterioară poate fi diferită (fig. 14.16). Fructokinaza este o enzimă cu o arie de răspîndire tisulară limitată : este prezentă numai în ficat, rinichi şi intestinul subţire

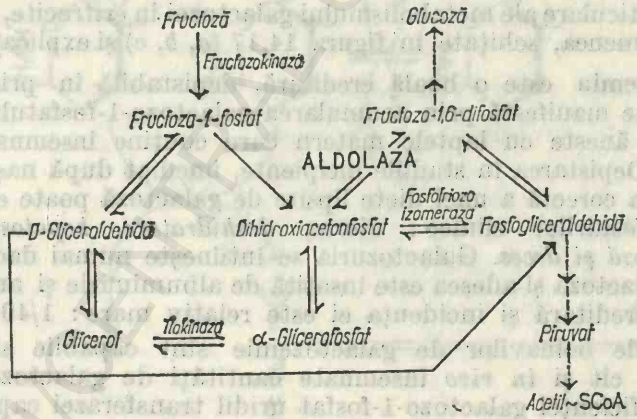


Fig. 14.16. — Metabolizarea fructozei în ţesuturile animale.

şi fosforilează ireversibil fructoza în prezenţa ATP şi a ionilor de K^+ şi Mg^{2+}.

Fructozo-1-fosfatul este hidrolizat de *aldolaza B hepatică* (denumită astfel de R u t t e r pentru a o deosebi de aldolaza *A* din muşchi şi alte ţesuturi şi de aldolaza *C* din creierul mamiferelor şi din ţesuturile foetale) cu formare de *D-gliceraldehidă* şi *dihidroxiacetonfosfat.* Aldolaza *B* este

prezentă în ficat, iar în țesutul renal și în duoden este hibridizată cu aldolaza *A*. Ambii produși ai reacției de hidroliză a fructozo-1-fosfatului trec în *glicerol* și respectiv în *α-glicerofosfat*, care sub acțiunea *triokinazei* sînt fosforilați, creînd astfel condițiile necesare pentru acțiunea aldolazei ce se soldează cu formare de fructozo-1,6-difosfat.

Metabolismul intermediar al galactozei. Caputto, Leloir și alții (1950) au descoperit metabolismul galactozei la microorganisme, iar trei ani mai tîrziu Kalckar și alții confirmă existența aceluiași mecanism la om, pentru care principala sursă de galactoză este lactoza prezentă în alimente, îndeosebi în lapte.

În prima etapă a metabolismului intracelular al galactozei, sub influența *galactokinazei* și în prezența ionilor de Mg^{++} se formează esterul fosforic *galactozo-1-fosfat*, care ulterior în prezența UDP-glucozei și a *galactozo-1-fosfaturidil transferazei* dă naștere UDP-galactozei și glucozo-1-fosfatului (fig. 14.17, reacția 2). Galactokinaza este inhibată de produsul reacției — galactozo-1-fosfatul. UDP-galactoza sub acțiunea unei epimeraze specifice — *UDP-galactozo-4-epimeraza* și a NAD^+, în calitate de coenzimă, se transformă în UDP-glucoză. Cantitatea totală de „epimerază" este reglată de raportul $NAD^+ \rightleftarrows NADH+H^+$ existent în țesutul hepatic. Uridindifosfat-glucoza este transformată de UDP-difosfoglucozopirofosforilază, în prezența UTP în glucozo-1-fosfat care trece în glucozo-6-fosfat sau poate fi utilizată pentru biosinteza glicogenului și a altor poliglucide (fig. 14.17). De asemenea, glucozo-1-fosfatul poate trece în f uctozo-6-fosfat sau în manozo-6-fosfat prin formarea esterului intermediar glucozo-6--fosfat.

Glucozo-6-fosfatul poate trece în cursul unor reacții de izomerizare sau de epimerizare fie în glucozo-1-fosfat (reacția 8), fie în galactozo-6--fosfat, respectiv (reacția 9).

Căile particulare ale metabolismului galactozei în eritrocite, creier și ficat sînt, de asemenea, schițate în figura 14.17 (*a*, *b*, *c*) și explicate în legendă.

Galactozemia este o boală ereditară, depistabilă în primele luni de viață, care se manifestă prin acumularea galactozo-1-fosfatului cînd noul născut se h ănește cu laptele matern care conține însemnate cantități de lactoză. Depistarea în stadiile incipiente, imediat după naștere, urmată de instituirea corectă a unei diete lipsite de galactoză poate evita dezvoltarea manifestărilor clinice: *diaree*, *deshidratare*, *hepatosplenomegalie*, *hepatită*, *ciroză* și *deces*. Galactozuria se întîlnește numai dacă dieta este bogată în galactoză și adesea este însoțită de albuminurie și aminoacidurie. Boala este ereditară și incidența ei este relativ mare: 1/40 000.

Eritrocitele bolnavilor de galactozemie sînt capabile să acumuleze atît *in vitro* cît și *in vivo* însemnate cantități de galactozo-1-fosfat ca urmare a deficienței galactozo-1-fosfat uridil transferazei capabile să medieze formarea de UDP-galactoză (v. fig. 14.17). Numeroși cercetători au încercat să demonstreze lipsa acestei enzime din eritrocite, dar toți au confirmat existența ei atît în eritrocite, cît și în ficat, leucocite, fibroblaști etc., dar activitatea enzimei este extrem de scăzută sau nu poate fi corect estimată. În această maladie congenitală organismul este total lipsit de posibilitatea de a utiliza galactoza, lucru demonstrat elegant de Segal și alții (1962) care au utilizat galactoză-1-^{14}C și nu au reușit

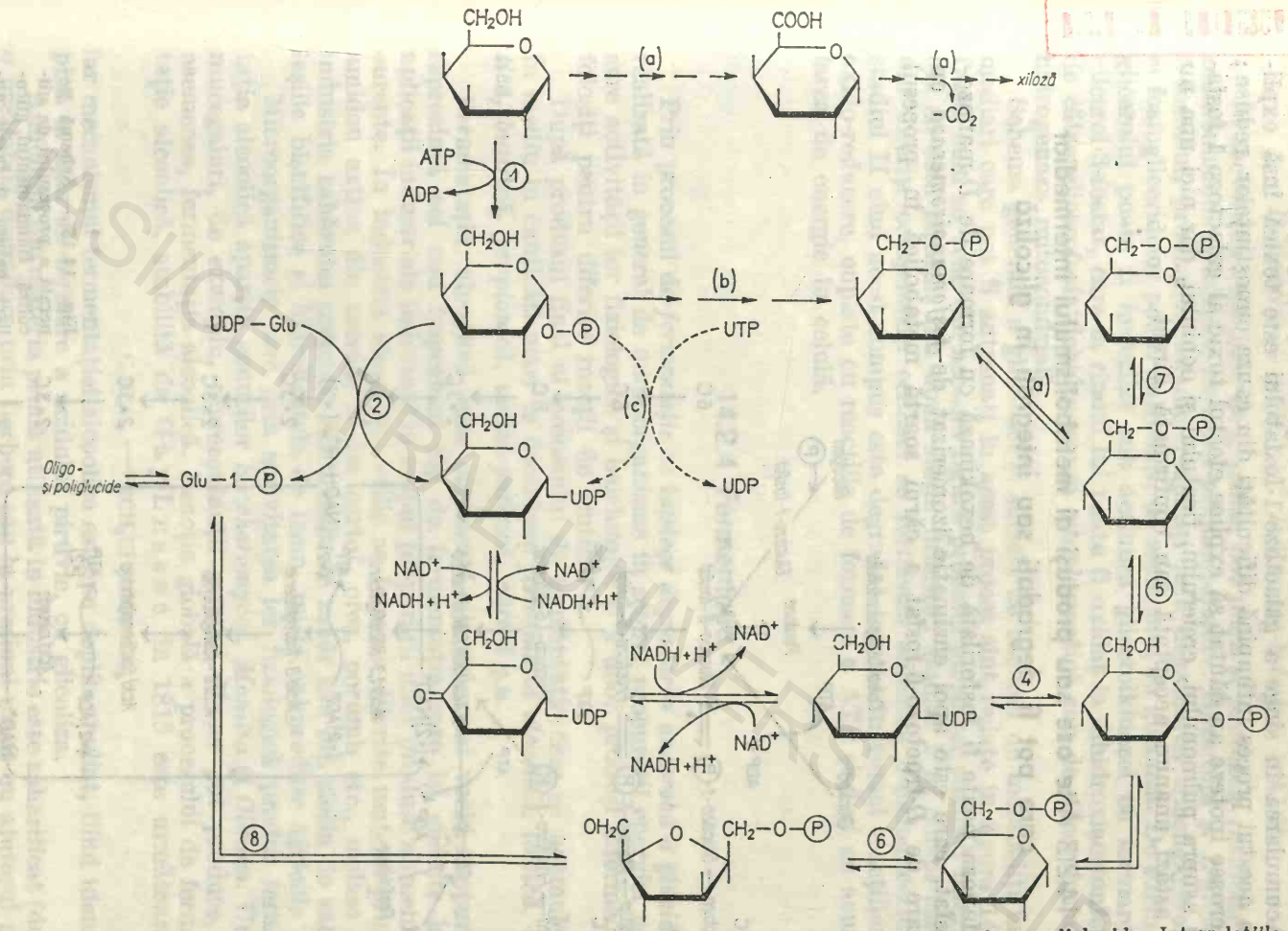


Fig. 14.17. — Metabolismul galactozei și calea utilizării ei pentru biosinteza glicogenului și a altor poliglucide. Interrelațiile genetice dintre diferite hexoze (galactoza, fructoza, manoza) derivații lor fosforilați și pentoze (xiloza). În unele organe și țesuturi galactoza este metabolizată și pe alte căi. Astfel, de exemplu, hepatocitul posedă o enzimă — galacto dehidrogeneza care poate oxida galactoza cu formare de acid galactonic transformat după aceea în acid ceto-galactonic și prin decarboxilare — în xiloză:

(*a*). Această enzimă hepatică a fost descrisă de Cuatrecasas și Segal, în 1966. O altă cale particulară de metabolizare a galactozei a fost descrisă de Postenak și Rosselet în 1954 pentru eritrocite, unde galactozo-1-fosfatul este transformat în galactozo-6-fosfat de către o fosfoglucomutază eritrocitară, iar acesta poate fi oxidat ulterior în prezența hexozo-6-fosfat dehidrogenazei eritrocitare în acid 6-fosfogalactonic (*b*). În țesutul hepatic și în creier Isselbacher (1958) și N g și alții (1964) au identificat și o altă enzimă, deosebită de galactozo-1-fosfat uridiltransferază și denumită γ-UDP-galactozo-pirofosforilaza care poate folosi galactozo-1-fosfatul în formarea uridindifosfat-galactozei (*c*).

evidențierea $^{14}CO_2$ în aerul expirat, sau dacă utilizarea galactozei se realizează sînt utilizate alte căi metabolice (fig. 14.17, *a*, *b*, *c*).

Acumularea în sînge a galactozo-1-fosfatului este toxică însă explicarea acestui proces întîmpină dificultăți din cauza cunoștințelor reduse; numeroase ipoteze au căutat să explice efectul toxic al galactozo-1-fosfatului asupra pulmonului, creierului, ficatului și ochiului, dar nici una nu este astăzi unanim acceptată sau confirmată direct.

14.2.3 Alte oze sau produși ai metabolismului intermediar care pot fi degradați sau integrați în glicoliză

Manoza poate fi fosforilată de hexokinază cu formare de *D*-manozo-6-fosfat, care este apoi enzimatic izomerizat de *fosfomanoizomerază* cu formare de *D*-fructozo-6-fosfat a cărui soartă metabolică în procesul

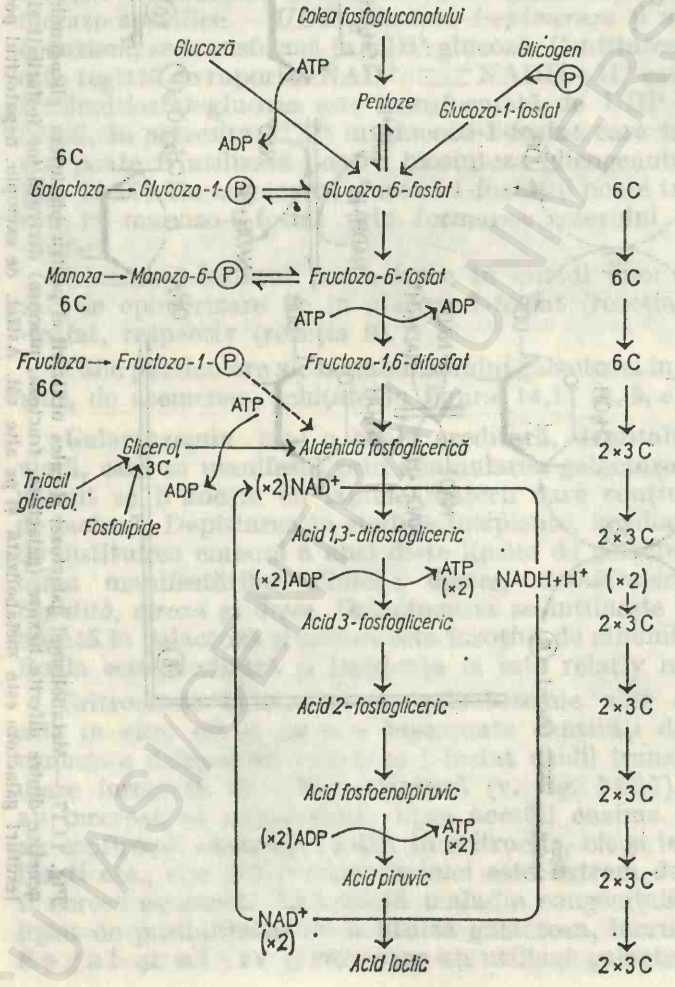


Fig. 14.18. — Schema generală a procesului de glicoliză. Randamentul glicolizei, natura și fazele antrenării compușilor metabolismului intermediar.

glicolizei a fost descrisă mai sus:

$$D\text{-Manoza} + ATP \rightleftharpoons D\text{-Manozo-6-fosfat} + ADP.$$

În secvențele reacțiilor de glicoliză pot intra și pentozele rezultate din metabolismul glucidelor pe *calea pentozofosfaților*. Glicerolul și *L*-glicerol-3-fosfatul, produși metabolici rezultați prin degradarea triacilglicerolilor și fosfogliceridelor pot fi antrenați, de asemenea, în glicoliză. De exemplu, glicerolul poate fi fosforilat sub acțiunea glicerolkinazei cu formare de glicerol-3-fosfat, care la rîndul lui poate fi oxidat la dihidroxiacetonfosfat de către glicerofosfatdehidrogenaza citoplasmatică sau de glicerofosfatdehidrogenaza mitocondrială.

Schema generală a glicolizei și sursele de oze sau de metaboliți intermediari care pot fi antrenați în acest proces sînt redate în figura 14.18. După cum se vede din această figură procesul glicolizei poate fi interpretat că este alcătuit din două stadii diferite: stadiul I în cursul căruia, din diferiți componenți celulari se formează aldehida 3-fosfoglicerică și stadiul II cînd acest compus este degradat treptat în cursul reacțiilor de oxido-reducere, cuplate cu reacțiile de formare a ATP și deci cu acumularea de energie în celulă.

14.2.4 Fermentația

Prin procesul de *fermentație se înțelege degradarea anaerobă a glucidelor* realizată în general de microorganisme în scopul procurării energiei necesare activității lor fiziologice și biochimice și a unor produși intermediari folosiți pentru diferite reacții de sinteză.

După produsul final al procesului de fermentație care se acumulează în mediu în cantități mari se deosebesc *fermentația alcoolică*, *lactică*, *acetică*, *butirică*, *propionică*, *aceton-butirică*, *citrică* ș.a.

Fermentația alcoolică este cunoscută din cele mai vechi timpuri și reprezintă cel mai important tip de fermentație care își găsește largi aplicații industriale îndeosebi în scopul preparării unor produse alimentare curente. În industria alcoolului etilic se folosesc diferite materii prime: amidon extras din cereale și din cartof, orez, porumb etc., melase din industria zahărului preparat din trestia de zahăr sau din sfecla de zahăr, leșiile bisulfitice și hidrolizatele de lemn, unele subproduse agricole ș.a.

Microorganismele care prin activitatea lor fiziologică produc fermentația alcoolică aparțin genurilor *Saccharomyces*, *Monilia* și *Oidium*. Unele mucegaiuri, de exemplu, reprezentanții genului *Mucor* pot produce, de asemenea, fermentația alcoolică. Reacția globală a procesului de fermentație alcoolică, stabilită de Gay-Lussac în 1815 este următoarea:

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2CH_3CH_2OH + 2CO_2$$

iar mecanismul fermentației alcoolice este pe deplin studiat, fiind identic, pînă la faza de formare a acidului piruvic, cu glicoliza.

Amidonul din materia primă utilizată în industrie este zaharificat (după o prealabilă degradare prin fierbere sau la presiuni mari) cu ajutorul preparatelor de malț verde sau de *preparate amilolitice* izolate din diferite mucegaiuri. Lichidul siropos rezultat fermentează alcoolic în prezența

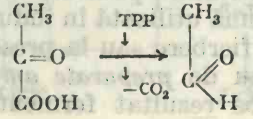
unor drojdii selecționate, rezistente la concentrații relativ mari de alcool și capabile să transforme „mustul" cu viteze relativ mari. Cînd în mediul de fermentație se introduc substanțe cu proprietăți antiseptice, spre exemplu, *pentafenilat de sodiu*, atunci este absolut obligatorie folosirea unei tulpini a microorganismului care este adaptată la aceste condiții de mediu.

În industria berii unde materiile prime sînt malțul de orz, uscat și măcinat și hameiul se utilizează *drojdii de fermentație inferioară și superioară*, în funcție de tipul de bere fabricat. Procesul de fermentație are loc în două etape distincte : *fermentația primară*, folosită în special pentru berea de fermentație inferioară, care are loc la temperatura de 5—8°C și durează aproximativ 7—8 zile și *fermentația secundară* care durează aproximativ 35—90 zile, la temperatura de 2—5°C. Berea este un produs perisabil, deoarece este stabilă maximum 5—7 zile, după care devine opalescentă și pe fundul vasului în care este păstrată apare un sediment. Opalescența berii se datorește proceselor de flocurare ca urmare a oxidării grupărilor —SH din proteine la grupări —S—S—, a combinațiilor care apar între substanțele proteice și taninurile provenite din malțul de orz sau din florile de hamei. În prezent, pentru combaterea flocurării și opalescenței berii se folosesc enzime proteolitice *(ficina, bromelaina, papaina)* care hidrolizează macromoleculele proteice la compuși cu mase moleculare mai mici și solubili, iar în scopul preîntîmpinării oxidării grupărilor SH se recomandă preparate de *glucoxidază* care determină scindarea unor mici cantități de glucoză prezente în bere și consumarea oxigenului din aerul prezent în recipient și deci stoparea oricăror procese de oxidare.

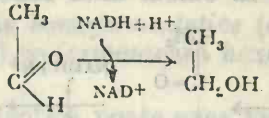
În industria de fermentație în scopul preparării țuicii și vinului folosirea drojdiilor selecționate asigură un proces de fermentație continuu și rapid, obținerea unor cantități mari de alcool și asigurarea unui buchet plăcut, datorită prezenței *produselor secundare ale fermentației*. Fermentarea mustului de struguri, a sucurilor de fructe și a borhotului de fructe decurge mai rapid și cu randamente mai mari dacă se folosesc preparate pectolitice extrase din diferite mucegaiuri. *Enzimele pectolitice* degradează hidrolitic substanțele pectice care au proprietatea de a reține un procet mare de apă, în cazul de față de suc, sporesc eliberarea substanțelor colorante, micșorează viscozitatea sucului și măresc viteza de filtrare, accelerează fermentația și grăbesc procesele de „îmbătrînire" sau „învechire".

Tot un proces de fermentație alcoolică este și do pirea aluatului de pîine în panificație și constă din fermentarea alcoolică a zaharozei și a maltozei din făină în prezența β-amilazei. Calitatea pîinii este condiționată de drojdia folosită pentru fermentare, de capacitatea glutenului de a reține dioxidul de carbon care se degajă și de activitatea enzimelor prezente în germenii de grîu.

Mecanismul biochimic care stă la baza procesului de fermentație alcoolică constă în următoarele : acidul piruvic format în cursul glicolizei este decarboxilat de *piruvat decarboxilază*, care are drept coenzimă tiaminpirofosfatul, cu formare de dioxid de carbon și aldehidă,



care la rîndul ei în prezența *alcool NAD oxidoreductazei* este redusă cu formare de alcool etilic conform reacției:

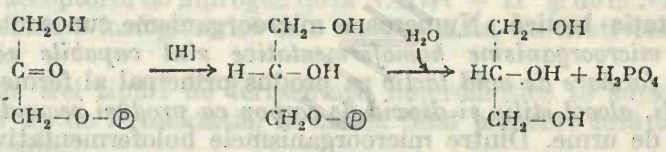


Regenerarea NADH + H^+ în cadrul fermentației alcoolice se realizează grație cuplării acestei reacții cu o reacție a glicolizei în care au loc procese de oxidare:

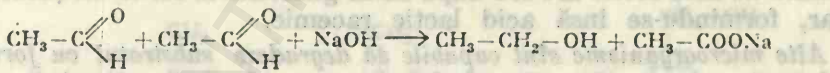
$$NAD^+ + \textit{Aldehidă fosfoglicerică} + H_3PO_4 \rightleftharpoons NADH + H^+ + \textit{Acid 1,3-difosfoglicerlc.}$$

Mecanismul fermentației alcoolice a fost confirmat și cu ajutorul izotopilor radioactivi ai ^{14}C folosindu-se fructoză marcată universal, adică la toți cei șase atomi de carbon, și redescoperindu-se atomii C_1 și C_6 în gruparea $-CH_3$ a alcoolului, atomii C_2 și C_5 în gruparea hidroximetil, iar atomii C_3 și C_4 în dioxidul de carbon.

Alcoolul etilic este principalul produs al fermentației alcoolice deoarece în cursul acestui proces se formează și numeroase produse secundare. Cînd acetaldehida rezultată prin decarboxilarea acidului piruvic este angajată în alte căi metabolice sau blocată imediat după formarea ei, *dihidroxiacetonfosfatul* produs intermediar al glicolizei, funcționează ca acceptor de hidrogen de la NADH + H^+ și are loc reacția:



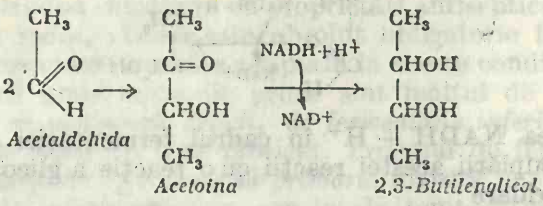
cînd se formează *glicerină*. Acest procedeu se folosește și la scară industrială și blocarea acetaldehidei se realizează cu *bisulfit de sodiu*, prin alcalinizarea mediului cu NaOH sau prin adăugare de zaharoză. În cazul alcalinizării mediului are loc reacția Cannizzaro:



în timp ce după adăugarea de zaharoză și bisulfit, în mediu apare $NaHSO_3$ care se combină cu acetaldehida. După un ciclu de fermentație plămada este separată de drojdie prin distilare, pentru recuperarea acetaldehidei și a alcoolului etilic; borhotul rămas se purifică, se concentrează și se distilă în vacuum cu vapori de apă pentru antrenarea glicerinei. Randamentul metodei de preparare a glicerinei este de 25%. Microorganismul *Zygosaccharomyces acidifaciens* este capabil să producă mari cantități de glicerină în condiții de *p*H variate.

Acidul piruvic este, de asemenea, un produs secundar al fermentației alcoolice cînd *p*H mediului este alcalinizat prin adăugarea de Na_2HPO_4 sau $MgHPO_4$ și se folosesc preparate uscate de drojdii. Acumularea acidului piruvic se explică prin anularea reacției lui de decarboxilare.

Alte produse secundare ale fermentaţiei alcoolice sînt *acetoina* şi *butilenglicolul* care se formează în cursul unor reacţii secundare:



cum se formează dealtfel şi mici cantităţi de *alcool amilic*, *alcool zoamilic* (obţinut prin decarboxilarea leucinei) *acid acetic*, *acid lactic*, *acid succinic*, *acid citric*, diferiţi *esteri* etc.

Fermentaţia alcoolică poate fi observată şi la plantele superioare sub forma unei „respiraţii anaerobe" cînd sînt puse în condiţii de anaerobioză (în timpul inundaţiilor, în procesul de germinare cînd învelişul seminţelor este impermeabil pentru oxigen, în procesul de coacere a fructelor etc.).

Dehidrogenazele din drojdiile de fermentare pot cataliza diferite reacţii de reducere în condiţii blînde de temperatură, transformînd *aldehida crotonică* în alcool butilic, *aldehida glicolică* în *etilenglicol*, cetonele în alcooli secundari, *metil-etil-cetona* în alcool butilic secundar etc. Ele sînt capabile să reducă NO_2, nitrobenzenul la anilină, SO_2 adăugat ca antiseptic la H_2S ş.a.m.d.

Fermentaţia lactică. Numeroase microorganisme cunoscute sub denumirea de *microorganisme homofermentative sînt capabile să fermenteze hexozele cu formare de acid lactic* ca produs principal al fermentaţiei şi de *acizi volatili*, *alcool etilic şi dioxid de carbon ca produşi secundari*, prezenţi sub formă de urme. Dintre microorganismele holofermentative fac parte *Bacillus lactis acidi*, *Bacillus delbruckii*, *Streptococcus lactic*, *S. cremonis*, *S. thermophilus*, *S. saccharolactic*, *Lactobacillus caucasicus*, *L. lactis*, *L. acidophilis*, *L. bulgaricus*, *L. bifidus*, *L. plantarum*, *L. casei*.

La microorganismele fermentaţiei lactice fermentarea hexozelor cu formare de acid lactic are loc după calea glicolizei la fel ca în ţesutul muscular, formîndu-se însă acid lactic racemic.

Alte microorganisme sînt capabile să degradeze substratul cu formare de acid lactic, alcool etilic, dioxid de carbon, acid acetic, glicerină, manită. Proporţia dintre produşii fermentării variază în funcţie de natura ozei fermentate, de specia microorganismului şi de condiţiile mediului de fermentare. Acest tip de microorganisme a fost numit *heterofermentativ* şi din el fac parte *Leuconostoc dextranicum*, *L. citrovorus*, *L. mesenteroides*, *Lactobacillus brevis*, *L. licopersici*, *L. pastorianus* etc., *Microbacterium flavum*, *M. lacticum* ş.a. Microorganismele heterolactice fermentează ozele după *calea pentozofosfatului* (v. mai departe, pag. 608—614),

Ţinînd seama de căile diferite ale fermentaţiei lactice realizate de microorganismele homo şi heterofermentative se pot distinge, după echipamentul enzimatic trei tipuri de bacterii:

— *bacterii lactice obligatoriu homofermentative* (conţin aldolază dar nu au glucozo-6-fosfat dehidrogenază, 6-fosfogluconat dehidrogenază);

— *bacterii lactice obligatoriu heterofermentative* (nu conţin aldolază, au în schimb hexozodehidrogenaze);

— *bacterii lactice facultativ homofermentative* (care conţine atît hexozo dehidrogenaze cît şi aldolază) ce fermentează hexozele cu formare de acid lactic pe calea glicolizei.

În rezumat, fermentaţia lactică poate avea loc după una din cele trei scheme prezentate mai jos.

a Glucoza $\longrightarrow$ Acid lactic + Alcool etilic + Dioxid de carbon

Procesul este realizat de speciile genului *Leuconostoc*, cînd aldehida 3-fosfoglicerică rezultată este metabolizată în întregime cu formare de acid lactic, iar acetilfosfatul este unicul acceptor de hidrogen de la NADH + H^+ şi NADPH+H^+ şi trece cantitativ în alcool etilic.

b 2Glucoză + Apă $\longrightarrow$ 2 Glicerol + Alcool etilic + Acid acetic + 2 Dioxid de carbon

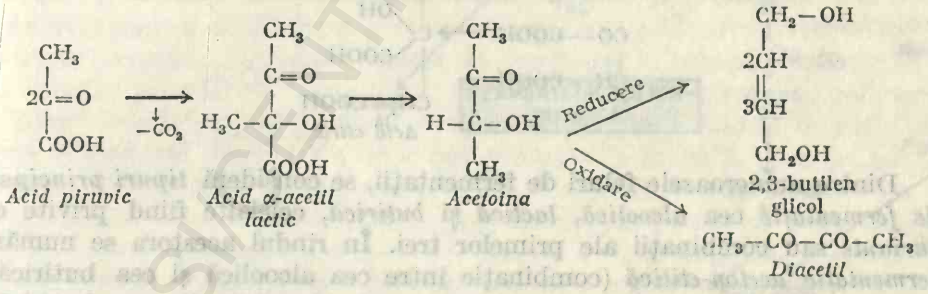
Acest tip de fermentaţie este realizat de *Lactobacillus brevis*, cînd aldehida 3-fosfoglicerică este acceptorul de hidrogen de la NADH + H^+; cel de-al doilea mol de NADH + H^+ reduce 1/2 mol de acetilfosfat cu formare de alcool etilic, iar 1/2 mol de acetilfosfat este transformat în acid acetic printr-un proces de transfosforilare.

c 3Fructoză + Apă $\longrightarrow$ Acid lactic + Acid acetic + Dioxid de carbon + Manită

Fructoza este acceptorul de hidrogen de la NADH + H^+ şi de la NADPH + + H^+ iar aldehida 3-fosfoglicerică este metabolizată cantitativ cu formare de acid lactic.

Practic cele trei tipuri de fermentaţii heterolactice se suprapun dar predomină un tip de fermentaţie, în mediu fiind prezente însă toate produsele menţionate.

Produsele secundare ale fermentaţiei lactice realizată în prezenţa microorganismelor din genul *Leuconostoc* sînt *acetoina*, *diacetilul*, *2,3-butilenglicolul*; acetoina rezultată din decarboxilarea *acidului α-acetil lactic* de către *α-acetil lactat decarboxilaza*:



Acid piruvic — *Acid α-acetil lactic* — *Acetoina* — 2,3-butilen glicol — *Diacetil*

Fermentaţia lactică este larg folosită în industria preparatelor de lapte (lapte acidofil, chefir, iaurt, lapte acru, brînzeturi etc.), în industria berii, vinului, alcoolului şi drojdiilor presate, în industria de conserve murate şi prepararea măslinelor pentru consum. Acidul lactic preparat pe această cale este folosit în industriile farmaceutică, alimentară, textilă,

a pielăriei (unde înlocuieşte taninurile, mai scumpe). Randamentul transformării hexozelor în acid lactic este de 85—90%.

Fermentaţia propionică *este realizată de microorganismele Propionibacterium, Micrococcus lactilyticus, Clostridium propionicum care fermentează acidul lactic, glucoza, zaharoza, maltoza, galactoza sau polialcooli* (sorbita, glicerina, manita) *cu formare de acid propionic,* după ecuaţia:

$$3CH_3CHOHCOOH \longrightarrow 2CH_3CH_2COOH + CH_3COOH + CO_2 + H_2O$$

Glucidele sînt degradate cu formare de acid lactic pe calea glicolizei, iar pentozele pe calea pentozofosfatului, cuplată cu glicoliza.

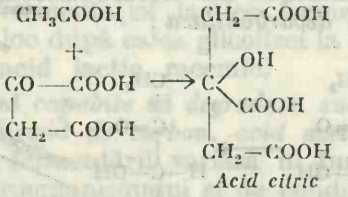
Fermentaţia butirică. *Fermentaţia butirică este provocată de microorganisme dintre care Bacillus butilicus este specific.* Prin fermentaţia butirică glucidele sînt transformate în *n-butanol* şi *acid n-butiric* ca produşi principali de reacţie, alături de care se mai formează ca produşi secundari: *alcool etilic, acid formic, acetic, lactic, dioxid de carbon.*

Fermentaţia butirică se petrece în condiţii naturale, pe scară largă, pe fundul bălţilor, în nămoluri, în solurile mlăştinoase unde accesul oxigenului este limitat.

Fermentaţia aceton-butirică. *Această fermentaţie este produsă de Clostridium acetobutilicum şi are ca rezultat formarea în cantităţi echimoleculare a acetonei şi alcoolului butilic.*

Atît fermentaţia acetonbutirică, precum şi cea butirică, dealtfel ca toate fermentaţiile, au ca punct de plecare tot acidul piruvic, care poate suferi diversele transformări ce-a ce explică provenienţa acetonei, alcoolului izopropilic, alcoolului butiric, acidului butiric, 2,3-butandiolului.

Fermentaţia citrică. *Fermentaţia citrică este realizată de ciupercile din clasele Citromiceteae, Penicil um şi Aspergilaceae,* printr-o *reacţie de condensare a acidului oxalilacetic cu acidul acetic,* identică cu prima din fazele ciclului acizilor tricarboxilici (degradarea aerobă a glucidelor):



Acid citric

Dintre numeroasele feluri de fermentaţii, se consideră *tipuri principale de fermentaţie* cea *alcoolică, lactică* şi *butirică,* celelalte fiind privite ca *variante* sau combinaţii ale primelor trei. În rîndul acestora se numără *fermentaţia aceton-etilică* (combinaţie între cea alcoolică şi cea butirică), *fermentaţia celulozei şi a substanţelor pectice* (derivată din cea butirică). Această situaţie se explică prin faptul că toate fermentaţiile au ca punct de plecare acidul piruvic, care prin diversele transformări enzimatice trece în acetonă, alcool izopropilic, alcool butilic, acid butiric, 2,3-butandiol, acetoina şi acid acetillactic (fig. 14.19).

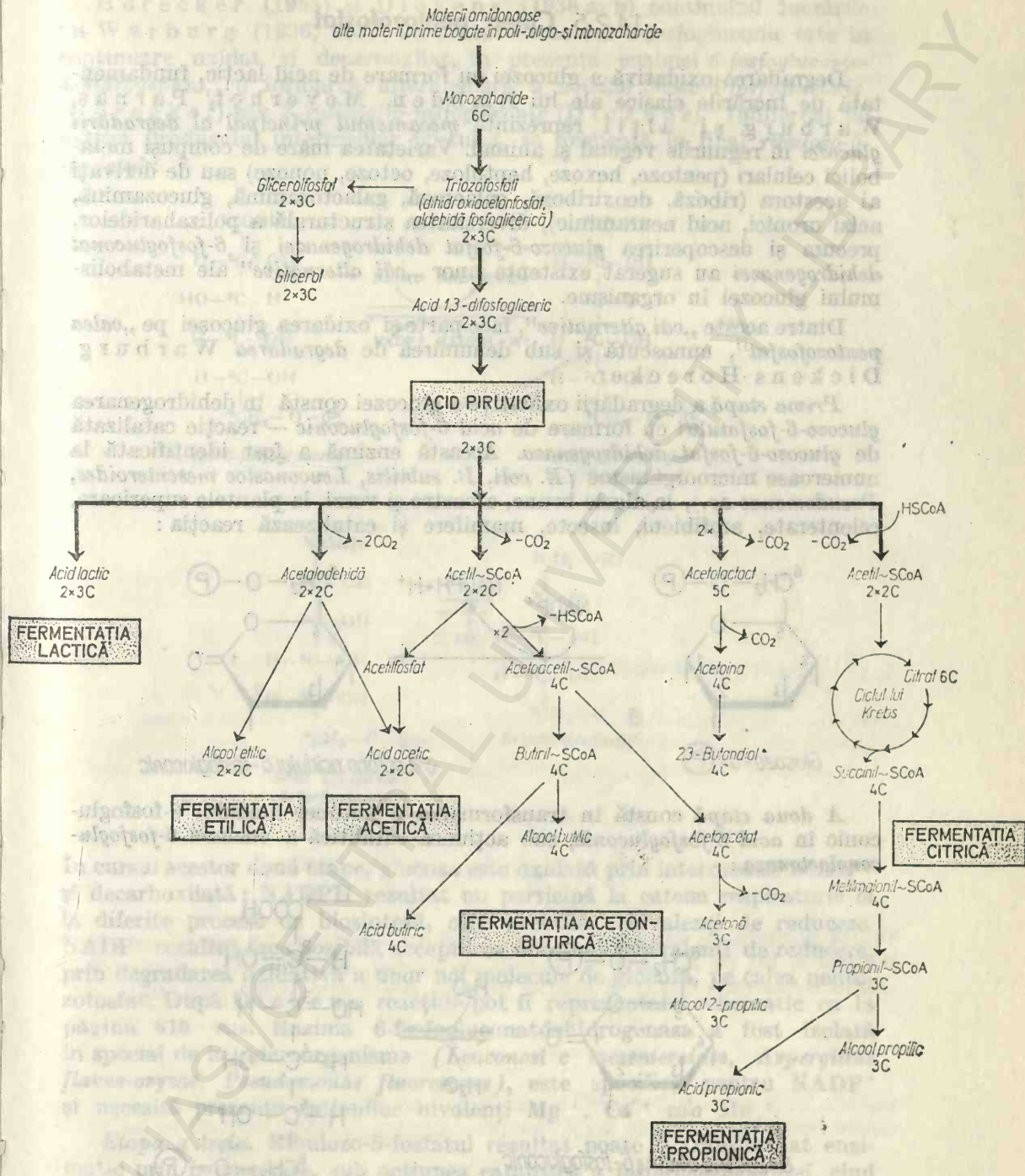


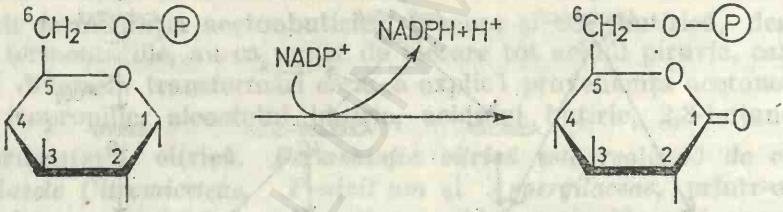
Fig. 14.19. — Interrelațiile dintre acidul piruvic și produșii intermediari și finali ai fermentațiilor.

14.2.5 Calea pentozofosfat

Degradarea oxidativă a glucozei cu formare de acid lactic, fundamentată de lucrările clasice ale lui Embden, Meyerhof, Parnas, Warburg şi alţii reprezintă *mecanismul principal al degradării glucozei* în regnurile vegetal şi animal. Varietatea mare de compuşi metabolici celulari (pentoze, hexoze, heptuloze, octoze, nonoze) sau de derivaţi ai acestora (riboză, deoxiriboză, galactoză, galactozamină, glucozamină, acizi uronici, acid neuraminic), diversitatea structurală a polizaharidelor, precum şi descoperirea *glucozo-6-fosfat dehidrogenazei* şi *6-fosfogluconat dehidrogenazei* au sugerat existenţa unor *„căi alternative"* ale metabolismului glucozei în organisme.

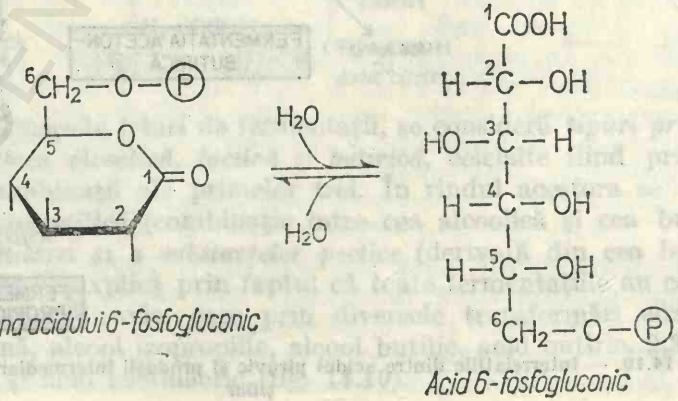
Dintre aceste *„căi alternative"*, face parte şi oxidarea glucozei pe *„calea pentozofosfat"*, cunoscută şi sub denumirea de *degradarea* Warburg-Dickens-Horecker.

Prima etapă a degradării oxidative a glucozei constă în dehidrogenarea *glucozo-6-fosfatului* cu formare de *acid 6-fosfogluconic* — reacţie catalizată de *glucozo-6-fosfat dehidrogenaza*. Această enzimă a fost identificată la numeroase microorganisme *(E. coli, B. subtilis, Leuconostoc mesenteroides, Pseudomonas sp.)*, la algele brune, albastre şi verzi, la plantele superioare, celenterate, amfibieni, insecte, mamifere şi catalizează reacţia:



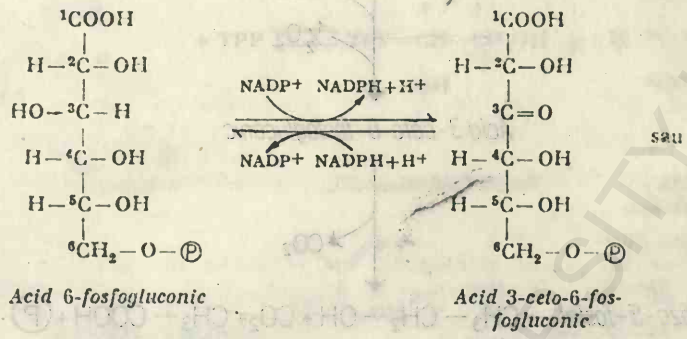
Glucozo-6-Ⓟ — δ-Lactona acidului 6-fosfogluconic

A doua etapă constă în transformarea δ-lactonei acidului 6-fosfogluconic în *acid 6-fosfogluconic*, sub acţiunea catalitică a enzimei *6-fosfogluconolactonaza*:

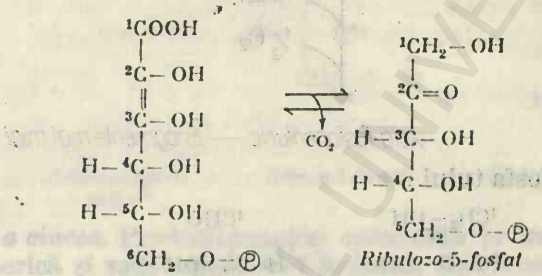


δ-Lactona acidului 6-fosfogluconic — Acid 6-fosfogluconic

Horecker (1953) și Dickens (1938 a, b) continuînd lucrările lui Warburg (1936, 1937) au arătat că acidul 6-fosfogluconic este în continuare oxidat și decarboxilat, în prezența enzimei *6-fosfogluconic-dehidrogenaza*, cu formarea intermediară a *acizilor 3-ceto-6-fosfogluconic* (Horecker) sau *2,3-dienol-6-fosfogluconic* (Dickens). Indiferent de natura produsului intermediar postulat, se formează în final *ribulozo-5-fosfatul*:



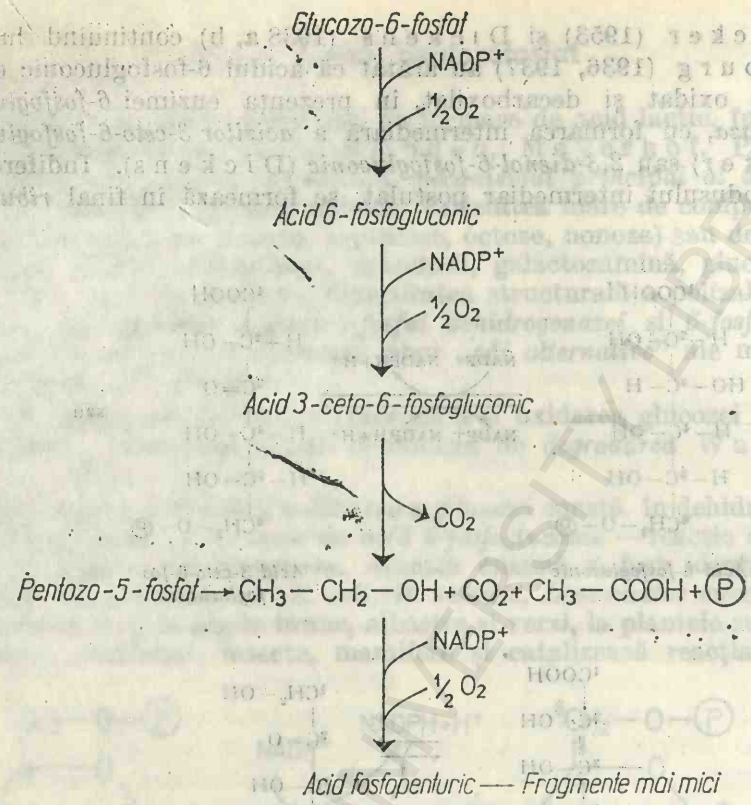
Acid 6-fosfogluconic — *Acid 3-ceto-6-fosfogluconic*



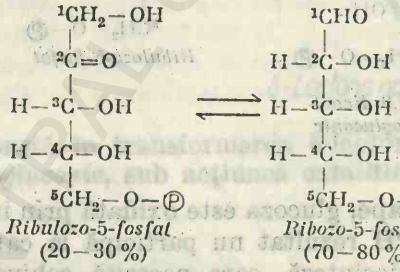
Acid 2,3-dienol-6-fosfogluconic — *Ribulozo-5-fosfat*

În cursul acestor două etape, glucoza este oxidată prin intermediul $NADP^+$ și decarboxilată; NADPH rezultat nu participă la catena respiratorie ci la diferite procese de biosinteză, care necesită echivalenți de reducere. $NADP^+$ rezultat face posibilă acceptarea unor noi echivalenți de reducere, prin degradarea oxidativă a unor noi molecule de glucoză, pe calea pentozofosfat. După Dickens reacțiile pot fi reprezentate schematic ca la pagina 610 sus. Enzima 6-fosfogluconatdehidrogenaza a fost izolată în special de la microorganisme *(Leuconost c mesenteroides, Aspergillus flavus-oryzae, Pseudomonas fluorescens)*, este specifică pentru $NADP^+$ și necesită prezența cationilor bivalenți Mg^{++}, Ca^{++} sau Mn^{++}.

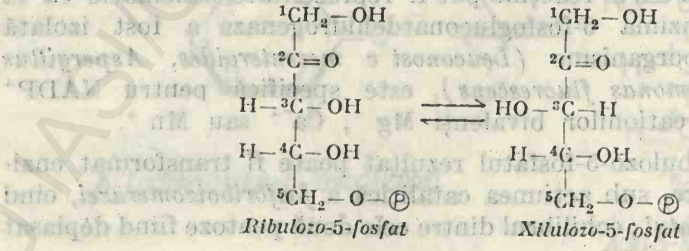
Etapa a treia. Ribulozo-5-fosfatul rezultat poate fi transformat enzimatic prin izomerizare, sub acțiunea catalitică a *fosforiboizomerazei*, cînd se formează *ribozofosfatul*; echilibrul dintre cele două pentoze fiind deplasat



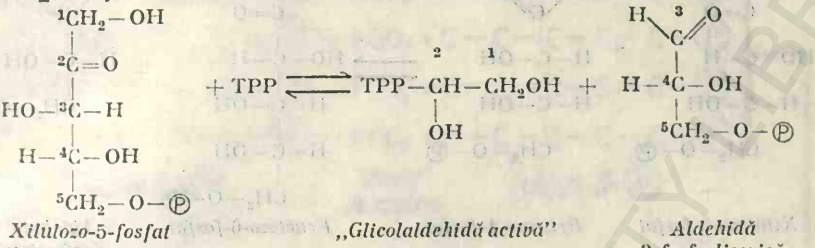
n favoarea ribozo-5-fosfa tului :

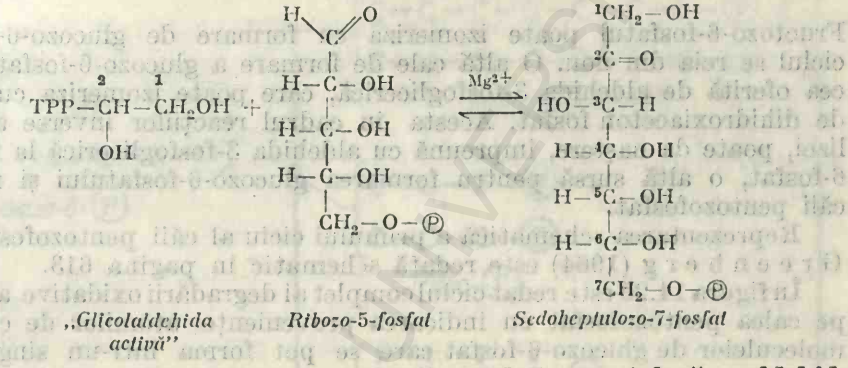


O altă posibilitate de transformare a ribulozo-5-fosfatului o reprezintă epimerizarea lui cu formare de *D-xilulozo-5-fosfat*, sub acțiunea *xilulozo-5-fosfat izomerazei*, specifică pentru formele *D* ale celor două pentoze :

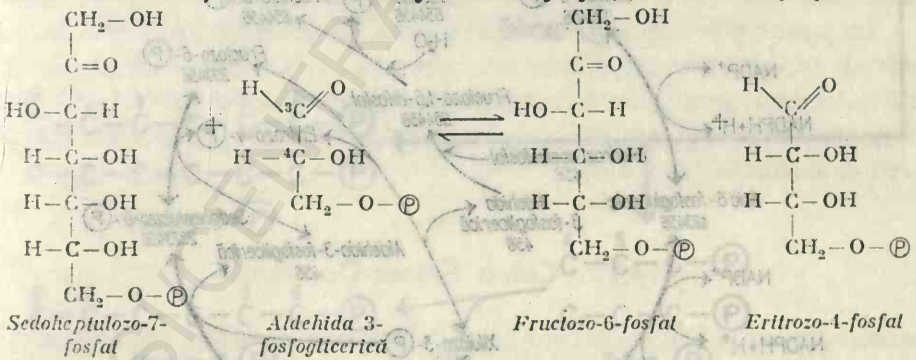


Etapa a patra. Cele două pentoze rezultate în aceste reacţii — ribozo-5-fosfat şi xilulozo-5-fosfat — sînt transformate sub acţiunea *transcetolazei*, în *sedoheptulozo-7-fosfat* şi *aldehidă 3-fosfoglicerică*. Mecanismul formării sedoheptulozo-7-fosfatului constă în transferul unui fragment de doi atomi de C, proveniţi din molecula xilulozo-5-fosfatului, pe molecula ribozo-5-fosfatului. Acceptorul acestui fragment de doi atomi de C este TPP, care îndeplineşte rolul de coenzimă în structura transcetolazei:





Etapa a cincea. Produşii reacţiei catalizate de transcetolază — aldehida 3-fosfoglicerică şi sedoheptulozo-7-fosfatul, sînt transformaţi sub acţiunea unei *transaldolaze*, cu formare de *fructozo-6-fosfat* şi *eritrozo-4-fosfat*:

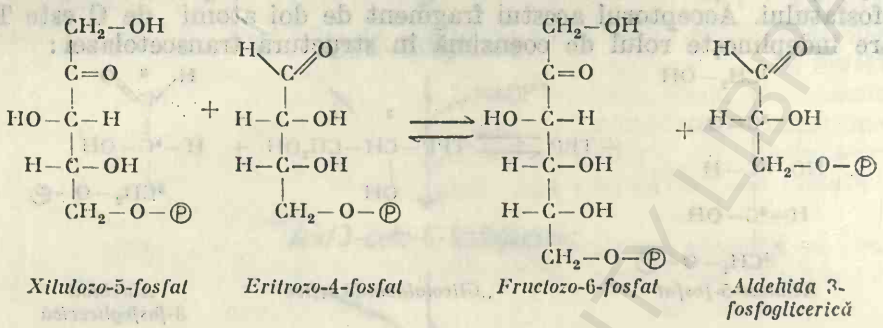


Transaldolaza funcţionează ca o enzimă de transfer, într-un mod similar cu cel al transcetolazei. Rezumînd ultimele două etape, se pot scrie următoarele egalităţi:

$$C_5 + C_5 = C_3 + C_7$$

$$C_7 + C_3 = C_6 + C_4$$

Etapa a şasea. Molecula de eritrozo-4-fosfat funcţionează în continuare ca un acceptor al unui fragment de doi atomi de C, care de data aceasta provin din molecula xilulozo-5-fosfatului, trecînd în *fructozo-6-fosfat*, în cursul unei reacţii catalizate de o *transcetolază*:



Fructozo-6-fosfatul poate izomeriza cu formare de glucozo-6-fosfat şi ciclul se reia din nou. O altă cale de formare a glucozo-6-fosfatului este cea oferită de aldehida 3-fosfoglicerică, care poate izomeriza cu formare de dihidroxiaceton fosfat. Acesta în cadrul reacţiilor inverse ale glicolizei, poate da naştere, împreună cu aldehida 3-fosfoglicerică la fructozo-6-fosfat, o altă sursă pentru formarea glucozo-6-fosfatului şi realuarea căii pentozofosfat.

Reprezentarea schematică a primului ciclu al căii pentozofosfat, după G r e e n b e r g (1964) este redată schematic în pagina 613.

În figura 14.20 este redat ciclul complet al degradării oxidative a glucozei pe calea pentozofosfat cu indicarea provenienţei atomilor de carbon ai moleculelor de glucozo-6-fosfat care se pot forma într-un singur ciclu.

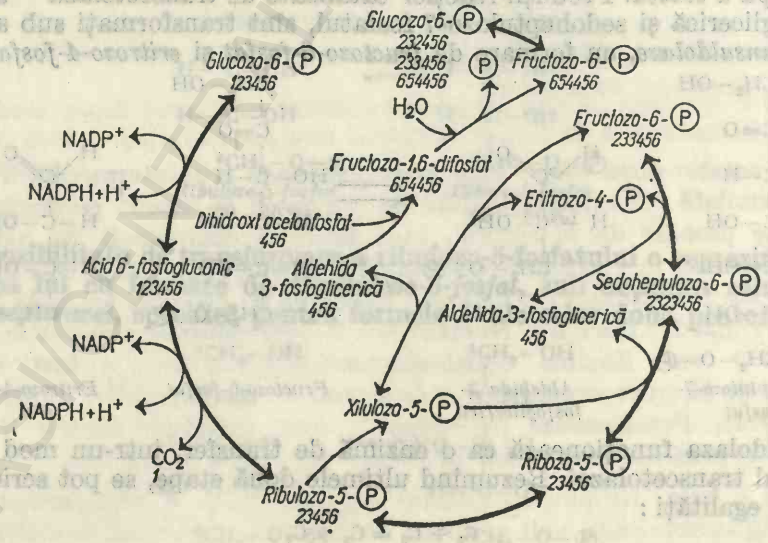
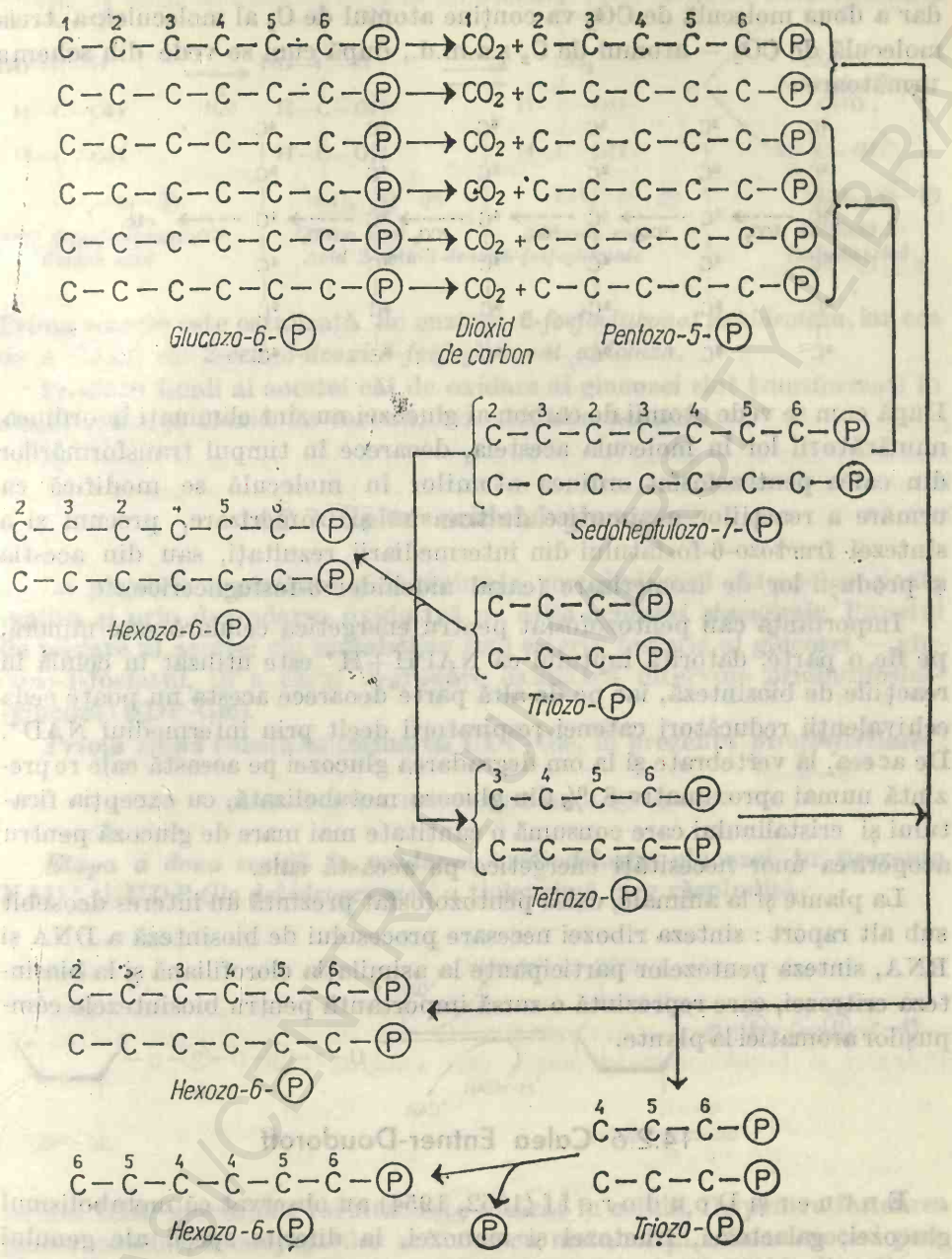
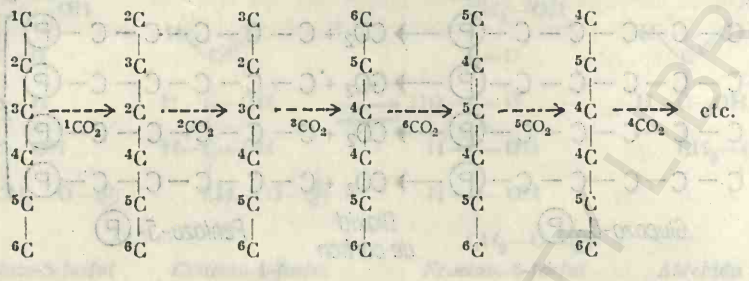


Fig. 14.20. — Degradarea oxidativă a glucozei pe calea pentozofosfat.



Reprezentarea Greenberg

Reluarea ciclului este însoțită de oxidarea glucozei pînă la dioxid de carbon, dar a doua moleculă de CO_2 va conține atomul de C_2 al moleculei, a treia moleculă de CO_2 — atomul de C_3 ș.a.m.d., după cum se vede din schema următoare:



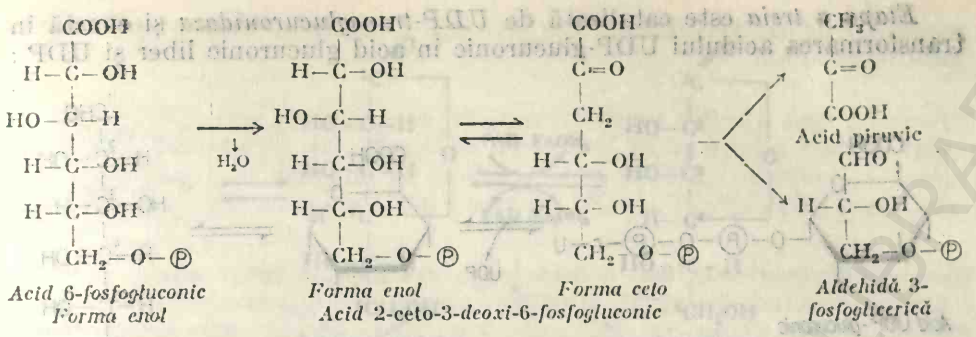
După cum se vede atomii de carbon ai glucozei nu sînt eliminați în ordinea numărătorii lor în molecula acesteia, deoarece în timpul transformărilor din calea pentozofosfat ordinea atomilor în moleculă se modifică ca urmare a reacțiilor enzimatice de transfer și izomerizare, precum și a sintezei fructozo-6-fosfatului din intermediarii rezultați, sau din aceștia și produșii lor de izomerizare (cazul aldehidei 3-fosfoglicerice).

Importanța căii pentozofosfat pentru energetica celulară este minoră, pe de o parte, datorită faptului că $NAPH+H^+$ este utilizat în celulă în reacțiile de biosinteză, iar pe de altă parte deoarece acesta nu poate ceda echivalenții reducători catenei respiratorii decît prin intermediul NAD^+. De aceea, la vertebrate și la om degradarea glucozei pe această cale reprezintă numai aproximativ 8 % din glucoza metabolizată, cu excepția ficatului și cristalinului care consumă o cantitate mai mare de glucoză pentru acoperirea unor necesități energetice pe această cale.

La plante și la animale, calea pentozofosfat prezintă un interes deosebit sub alt raport: sinteza ribozei necesare procesului de biosinteză a DNA și RNA, sinteza pentozelor participante la asimilația clorofiliană și la biosinteza eritrozei, care reprezintă o sursă importantă pentru biosintezele compușilor aromatici la plante.

14.2.6 Calea Entner-Doudoroff

E n t n e r și D o u d o r o f f (1952, 1954) au observat că metabolismul glucozei, galactozei, fructozei și manozei, la diferite specii ale genului *Pseudomonas* (*P. fluorescens*, *P. saccharophila* ș.a) are loc pornind de la glucozo-6-fosfat care trece în acid 6-fosfogluconic. Acesta însă este în continuare metabolizat într-un mod particular, deosebit de calea pentozofosfat, cu formare de acid piruvic și aldehidă 3-fosfoglicerică, conform reacțiilor:



Acid 6-fosfogluconic
Forma enol

Forma enol
Acid 2-ceto-3-deoxi-6-fosfogluconic

Forma ceto

Aldehidă 3-fosfoglicerică

Prima reacție este catalizată de enzima *6-fosfogluconat dehidrataza*, iar cea de a doua, de *2-ceto-3-deoxi-6-fosfogluconat aldolaza*.

Produșii finali ai acestei căi de oxidare ai glucozei sînt transformați în alcool etilic și dioxid de carbon, via aldehida acetică.

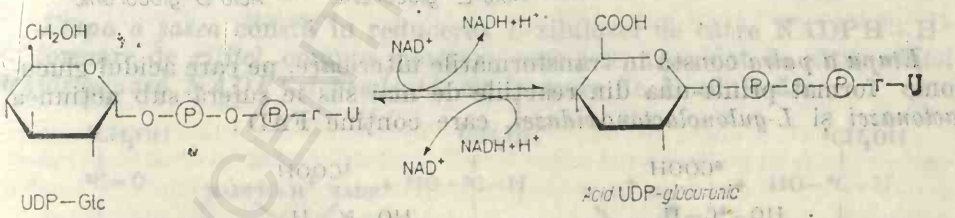
14.2.7 Calea acidului glucuronic

La plantele superioare și la animale, metabolismul glucozei se poate realiza și prin degradarea oxidativă pe *calea acidului glucuronic*. Punctul de plecare al acestei căi metabolice este esterul fosforic al glucozei — glucozo-1-fosfatul, în a cărui degradare oxidativă intervine uridindifosfat-glucoza (UDP-Glc).

Prima etapă constă în formarea UDP-Glc, în prezența *pirofosforilazei* :

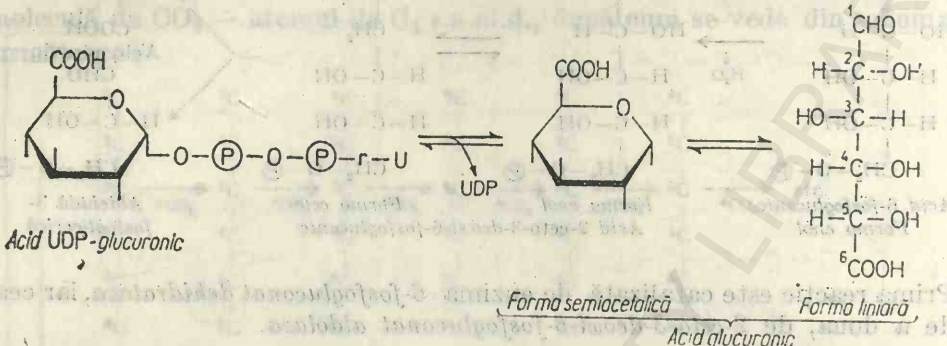
$$\textit{Glucozo}\text{-1-Ⓟ} + \text{UTP} \longrightarrow \text{UDP-Glc} + \text{Ⓟ—O—Ⓟ}$$

Etapa a doua rezidă în oxidarea uridindifosfat-glucozei, în prezența NAD^+ și *UDP-Glc dehidrogenazei*, o tiolenzimă larg răspîndită :

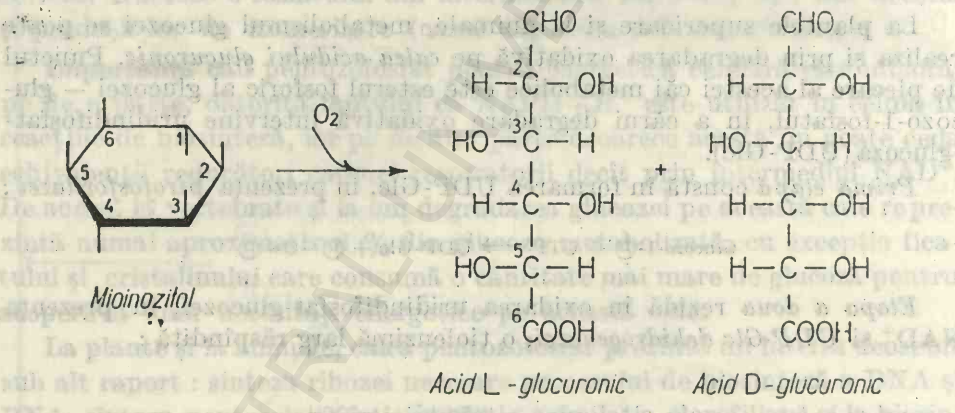


Acidul UDP-glucuronic rezultat este utilizat în celulă, fie pentru formarea glucuronidelor, a conjugaților acidului cu metaboliții celulari nocivi pentru organism, fie pentru biosinteza glucan proteinelor (peptidoglicanilor și proteinoglicanilor) sau pentru biosinteza acidului ascorbic (cu excepția organismului omenesc, a cobaiului și primatelor, toate celelalte organisme sînt capabile să sintetizeze acid ascorbic din acid UDP-glucuronic).

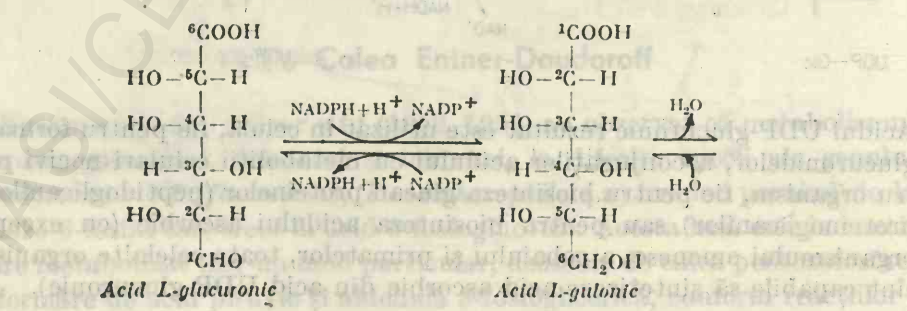
Etapa a treia este catalizată de *UDP-transglucuronidaza* și constă în transformarea acidului UDP-glucuronic în acid glucuronic liber și UDP :

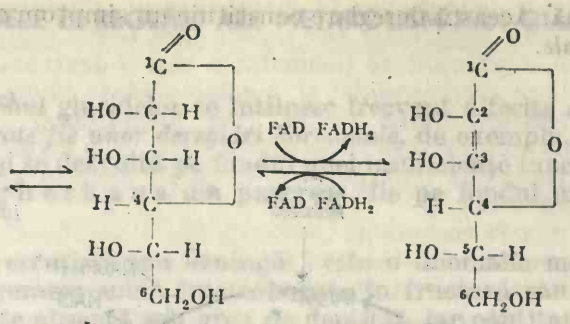


S-a dovedit că în organismele animale, unde la nivelul rinichilor se întîlnesc cantități apreciabile de mioinozitol, acidul glucuronic se poate forma în cursul unei reacții de scindare oxidativă cu apariția unui amestec racemic de acizi *L-* și *D*-glucuronici :



Etapa a patra constă în transformările ulterioare, pe care acidul glucuronic format printr-una din reacțiile de mai sus le suferă sub acțiunea *lactonazei* și *L-gulonolactonoxidazei*, care conține FAD :

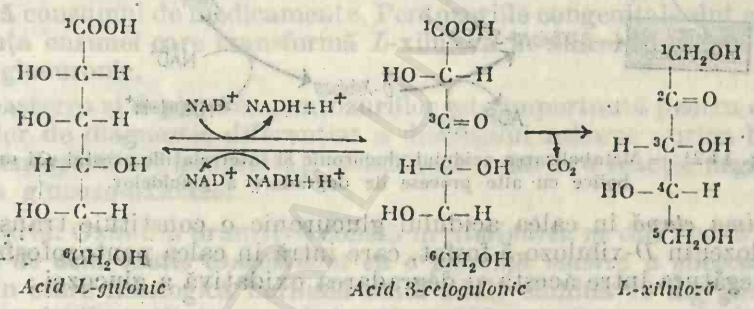




Lactona acidului L-gulonic — *Acid L-ascorbic*

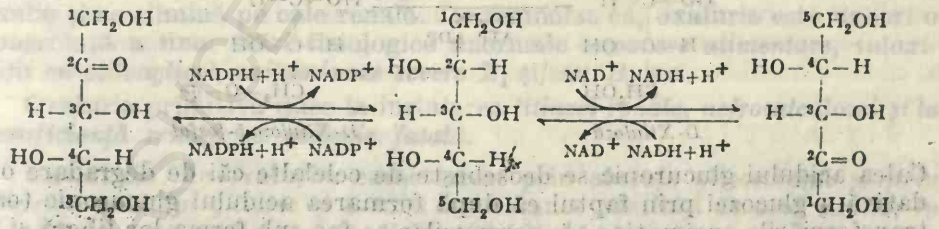
După cum se vede din aceste reacții, gruparea aldehidică a acidului *L*-glucuronic de la nivelul atomului C_1 este redusă cu apariția unei funcțiuni alcool primare și acest atom devine în acidul *L*-gulonic format C_6, acidul făcînd parte din seria *L*. Seria este menținută și în lactona acidului, precum și în acidul *L*-ascorbic, care este produsul final al acestor reacții.

Etapa a cincea se întîlnește cînd în celulă, acidul *L*-gulonic este oxidat la nivelul atomului C_3 și ulterior decarboxilat cu formare de *L*-xiluloză, compus de plecare pentru biosinteza altor pentoze, care stabilesc legăturile metabolice cu *calea pentozofosfat*. Formarea *L*-xilulozei poate fi scrisă astfel :



Acid L-gulonic — *Acid 3-cetogulonic* — *L-xiluloză*

Etapa a șasea constă în reducerea *L*-xilulozei de către $NADPH+H^+$ cu formare de *xilitol*, compus simetric, care este reoxidat de către *xilitol dehidrogenază NADP⁺ dependentă*, cu formare de *D*-xiluloză :



L-Xiluloză — *Xilitol* — *D-Xiluloză*

Dacă activitatea xilitol dehidrogenazei $NADP^+$ dependentă este redusă sau inhibată, *L*-xiluloza nu mai este transformată în *D*-xiluloză ci elimi-

nată prin urină. Această dereglare constituie un simptom caracteristic *pentozuriei esențiale.*

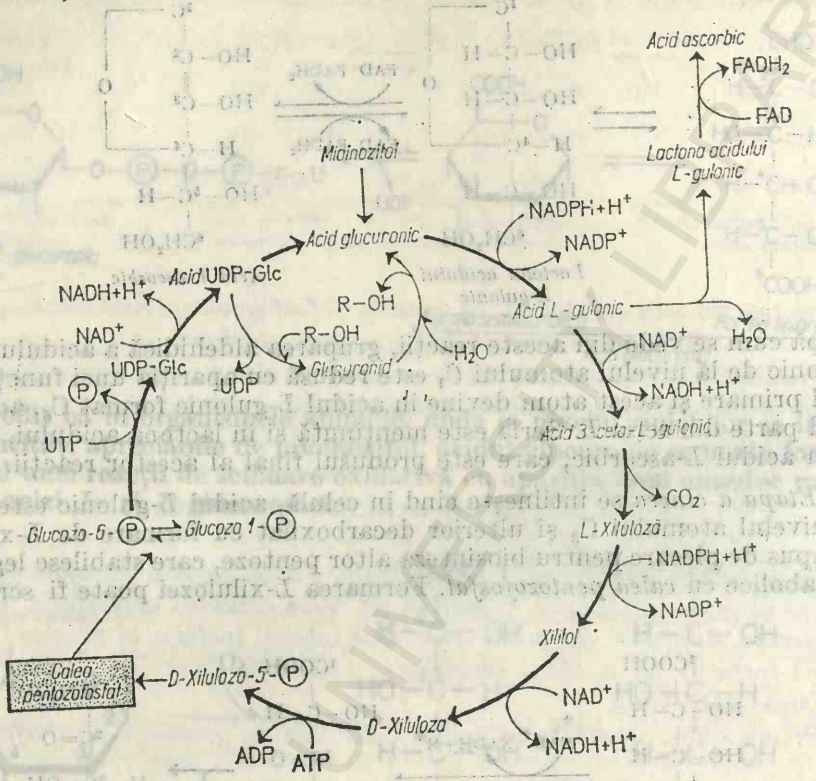
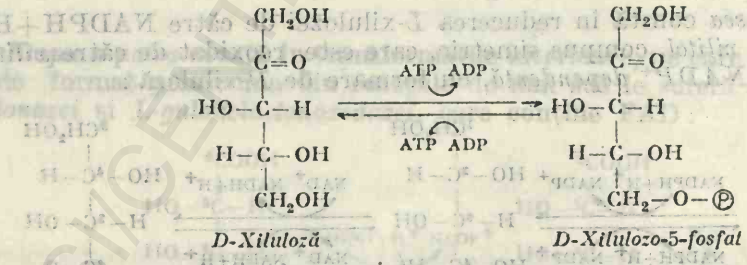


Fig. 14.21. — Metabolizarea acidului glucuronic și interrelațiile acestei căi metabolice cu alte procese de degradare a glucidelor.

Ultima etapă în calea acidului glucuronic o constituie transformarea *D*-xilulozei în *D*-xilulozo-5-fosfat, care intră în calea pentozofosfat, făcînd astfel legătura între aceasta și degradarea oxidativă a glucozei:



Calea acidului glucuronic se deosebește de celelalte căi de degradare oxidativă a glucozei prin faptul că după formarea acidului glucuronic toate transformările enzimatice ale compușilor se fac sub forma lor liberă și nu sub formă de esteri fosforici.

Metabolizarea glucidelor pe calea acidului glucuronic este reprezentată schematic în fig. 14.21.

14.3 UNELE DEREGLĂRI ALE METABOLISMULUI GLUCIDIC

În metabolismul glucidelor se întîlnesc frecvent diferite *stări anormale, patologice, datorate fie unor dereglări hormonale,* de exemplu, *diabetul zaharat,* care apare și se dezvoltă pe fondul unei insuficiențe funcționale a celulelor lui Langherhans din pancreas, fie pe fondul unor modificări genetice.

Fructozuria esențială sau benignă este o anomalie metabolică care apare după ingerarea unor fructe bogate în fructoză sau a zaharozei. Fructozemia este absentă sau greu de depistat, iar cantitatea de fructoză consumată nu este eliminată total pe cale urinară, deoarece numai 15% poate fi dozată chimic în urină. Boala care este ereditară și se transmite după un mecanism recesiv autosomic *se datorește deficienței de fructokinază hepatică.*

Intoleranța ereditară față de fructoză se concretizează prin *crize hipoglicemice* și vomă după ingerarea de zaharuri și de fructe, iar uneori prin *albuminurie, hepatomegalie, aminoacidurie, icter* ș.a. Activitatea aldolazei serice care hidrolizează fructo-1,6-difosfat/fructozo-1-fosfat este mult mai mare față de starea normală.

Pentozuriile. *Pentozuriile* sînt boli ereditare de tip recesiv întîlnite aproape exclusiv în rîndul populațiilor evreiești originare din Europa Centrală și la libanezi. Bolnavii *excretă în urină L-xiluloză* — 3—4 g/24 ore — îndeosebi după consumul de medicamente. Pentozuriile congenitale sînt generate de absența enzimei care transformă *L*-xiluloza în xilitol în cadrul ciclului acidului glucuronic.

Cunoașterea și depistarea pentozuriilor este importantă pentru evitarea confuziilor de diagnostic diferențiat a diabetului zaharat : urina bolnavilor de pentozurii are proprietăți reducătoare, dar are reacție negativă în prezența glucozo-oxidazei.

Oxaluria. Oxaluria primitivă constă în *eliminarea pe cale renală de mari cantități de acid oxalic concomitent cu o prezență masivă a glicocolului în urină.* În stare fiziologică normală omul adult elimină 40 mg glicocol/24 ore; în oxalurii cantitatea acestuia atinge 200 mg. *Cauza oxaluriei* primitive este *deficiența 2-cetoglutaratglioxilat carboligazei,* enzimă care catalizează reacția dintre acidul α-cetoglutaric și acidul glioxalic cu formare de *acid α-hidroxi-β-cetoadipic.* În lipsa enzimei acidul glioxalic trece în acid oxalic și se elimină pe cale renală. De semnalat că, oxaluria este uneori o consecință a unor stări fiziologice anormale — *excese alimentare, intoxicații cu etilenglicol, avitaminoze severe* B_1 și/sau B_6 ș.a.

Oxaluria primitivă duce la instalarea *litiazei renale, nefrocalculozei și la insuficiență renală cu evoluție fatală.*

Un alt tip de oxalurie, caracterizat prin *absența glicocolului și prin prezența acidului gliceric* și a unei importante *cantități de acid oxalic, în urină,* se datorește absenței *D-gliceraldehid dehidrogenazei acide* care conține NAD în calitate de coenzimă. În acest caz acidul hidroxipiruvic este transformat în acid gliceric, probabil, de lacticodehidrogenază. Mecanismul enzimatic al acestei oxalurii este încă insuficient studiat.

Alte deficiențe enzimatice în metabolismul glucidelor. Bordura în perie a vilozităților intestinale este sediul unui bogat echipament enzimatic alcătuit din α-glucozidaze (izomaltaza sau α-dextrinaza, sucraza sau invertaza, maltaze termostabile) și β-galactozidaze (lactaza, β-galactozidaza, hetero-β-galactozidaza neutră) care hidrolizează diozele maltoza, izomaltoza, zaharoza, lactoza și celobioza. Monozele rezultate în urma hidrolizei enzimatice sînt transportate activ cu diferite viteze (glucoza > >galactoza >fructoza).

Cercetările relativ recente au evidențiat *deficiența ereditară de zaharază și izomaltază, care este simultană.* S e m e n z a a reușit să izoleze de la iepure o enzimă alcătuită din două subunități cu activități catalitice diferite : o subunitate este dotată cu activitate specifică sucrazei sau zaharozei, iar a doua subunitate are activitate izomaltazică. Acest fapt explică deficiența simultană a celor două enzime și tulburările care survin : *intoleranța la zaharoză și instalarea unei diarei severe.*

Intoleranța la lactoză manifestată prin *încetinirea creșterii la copii, prin lactozurie și prin afecțiuni intestinale se datorește lipsei de lactoză* în bordura în perie a vilozităților intestinale. În rîndul populației albe deficitul tardiv de lactază este relativ frecvent (10‰), dar în unele grupe etnice — rasele neagră și galbenă — el poate atinge 90‰.

Diabetul și acțiunea insulinei asupra metabolismului glucidic. Insulina determină o permeabilizare a membranelor celulare pentru glucoză, facilitînd utilizarea acesteia de către țesuturile periferice — țesutul adipos, muscular — concomitent cu o reducere a *glicogenolizei hepatice,* ceea ce declanșează în cele din urmă instaurarea stării de *hipoglicemie.* Trebuie însă menționat și faptul că insulina facilitează și pătrunderea în celulă a L-arabinozei, D-xilozei și -D-galactozei.

Efectul insulinei asupra metabolismului glucidic poate fi, explicat în parte prin activarea unor enzime sau a biosintezei lor — glucokinaza, glicogen sintetaza, fosfofructokinaza și piruvatkinaza și prin inhibiția de către insulină a glucozo-6-fosfatazei și fructozo-1,6-difosfatazei. Pornind de la aceste observații experimentale unii cercetători consideră că *insulina are o dublă acțiune : rapidă — prin stimularea sau inhibiția enzimelor deja existente* și *lentă — prin sinteza de noi molecule enzimatice pe o moleculă de mRNA nou sintetizat.*

Insulina acționează asupra hexokinazei, influențînd indirect sinteza glicogenului hepatic și oxidarea sporită a glucozei în mușchi. Fixîndu-se pe suprafața membranelor celulare, insulina mărește permeabilitatea acestora față de glucoză, care este fosforilată după pătrunderea ei în celulă. Acțiunea insulinei se manifestă asupra tuturor monozaharidelor care au la primii trei atomi de carbon aceeași configurație cu glucoza. Metabolismul ulterior al monozaharidelor în celulă este limitat de activitatea aparatului enzimatic celular.

I l y i n și T i t o v a (1965) au semnalat pentru prima dată că între *insulină și hexokinază se formează un complex pe seama legării grupărilor sulfhidril ale enzimei de către insulină.* Acest complex preîntîmpină sau îndepărtează inhibiția enzimei de către cortizon și hidrocortizon (T i t o v a 1974, *b*). Ulterior, T i t o v a (1974, *a*, *b*) semnalează că *insulina și ocitocina acționează ca efectori alosterici, modificînd structura cuaternară a hexokinazei prin asocierea acesteia în doi dimeri catalitic activi.* Această modificare

a structurii cuaternare face imposibilă reacția dintre hormonii glucocorticoizi și hexokinază și deci anihilează acțiunea inhibitorie a acestora asupra enzimei.

P a v e l (1965) consideră că *starea de hiperglicemie este determinată de efortul pe care-l face organismul de a se adapta la condițiile noi create de lipsa insulinei.* La om cantitatea de glucoză eliminată prin urină — *glicozuria* — poate varia în limite foarte largi de la 1 240 mg/zi (P a v e l și P i e p t e a, 1965) la 2 278 mg/zi (B o u l i n, 1961).

Simptome de diabet se întîlnesc și în cazul unui *exces de hormoni diabetogeni*, secretați de hipofiză sau de cortexul glandelor suprarenale.

Diabetul zaharat este o *boală incurabilă* care poate fi *controlată clinic printr-un regim alimentar adecvat*, asociat sau nu cu *administrarea periodică a insulinei* sau a altor hipoglicemiante.

Activitatea preparatelor de insulină se exprimă în unități per ml. O unitate insulinică este echivalentă cu cantitatea de hormon necesară pentru diminuarea nivelului glicemiei de la 120 mg% la 45 mg% la un iepure normal de 2 kg după o perioadă de 24 ore de la ultima alimentare.

Acțiunea fiziologică a insulinei. C a w l e y în 1788 este primul care remarcă existența unei strînse relații între pancreas și diabet, iar M e h r i n g și M i n k o w s k y în 1890 reușesc să demonstreze experimental că pancreatectomia totală la cîine este întotdeauna însoțită de apariția unui diabet foarte grav, caracterizat prin hiperglicemie crescută (pînă la 400 — 500 mg%), *glicozurie, oboseală, predispoziție la infecții, scăderea în greutate* (zilnic cu peste 100 grame) și în *final moartea* animalului. Dintre animalele de laborator numai șobolanul este mai rezistent la pancreatectomie deoarece se îmbolnăvește de diabet, numai după aproximativ patru luni de la ablația pancreasului.

Mai tîrziu, în anul 1902, S o b o l e v practicînd ligatura canalului W i r s u n g demonstrează că acinii glandulari joacă un rol important în apariția diabetului, iar în 1943 D u n n arată că numai celulele β sînt responsabile de declanșarea acestei boli.

La animalele de laborator, toate tipurile diabetului zaharat cunoscute în clinica umană au fost reproduse experimental prin toxice selective ale celulelor β pancreatice, prin supraalimentația zaharată (tehnica perfuziei cu soluții de glucoză concentrată), prin exces de hormoni hipofizari, tiroidian sau corticosuprarenal, prin deficit pancreatic, pancreatectomie etc., (deși animalele de laborator nu aveau o predispoziție ereditară diabetică).

Dintre toate tipurile de diabet experimental numai diabetul aloxanic experimental reproduce cel mai bine diabetul uman (L e i t e s, 1950). Tot pe cale experimentală, folosindu-se florizina se obține un diabet zaharat care se explică însă prin aceea că glucozuria care se instalează este rezultatul unei incapacități a tubulilor renali de a reabsorbi glucoza.

Modificarea reversibilă a stării funcționale a celulelor β din insulele lui L a n g e r h a n s, însoțită de glicozurii trecătoare apare și în cursul unor infecții pancreatrope (hepatită virală, oreion, scarlatină, gripă, febră tifoidă, pojar), în unele intoxicații cu medicamente (cortizon, diamidină etc.) sau cu oxid de carbon.

În diabetul experimental provocat la iepuri cu ajutorul aloxanului, ditizonei și 8 (-*p*-toluolsulfanilamino)-chinolină s-a constatat că în insulele lui L a n g e r h a n s concentrația zincului scade considerabil (L a z a r i s și a l ț i i, 1971).

Decompensarea funcțională a pancreasului poate surveni la orice vîrstă, cel mai mare procentaj se întîlnește însă la a șasea decadă a vieții, iar la femei după instalarea menopauzei. Printre factorii care favorizează apariția diabetului majoritatea autorilor enumeră vîrsta înaintată, alimentația excesivă — însoțită de cele mai multe ori de obezitate, viața citadină, profesiunile sedentare și cele însoțite de emoții puternice, precum și ereditatea.

În privința modalității de transmitere a diabetului zaharat părerile cercetătorilor sînt împărțite : după unii ereditatea ar fi de tip recesiv, după alții de tip intermediar sau de tip dominant. P a v e l pe baza analizei statistice a cazurilor înregistrate la Centrul antidiabetic din Buucrești ajunge la concluzia că *diabetul zaharat* se transmite după tipul dominant, deoarece se face prin homozigoți (AA) și prin heterozigoți (Aa), ca dealtfel și *diabetul renal*, sinalbumina lui W a l l a c e - O w e n.

Frecvența cazurilor de diabet zaharat crește paralel cu vîrsta. Între 10 și 60 de ani, frecvența crește de peste două ori și jumătate, iar peste 60 de ani se dublează la fiecare opt ani atingînd un maximum între 70 și 80 de ani. Acest lucru este cu atît mai îngrijorător cu cît după unele ipoteze, emise de cercetători avizați, toate cazurile de diabet sînt ereditare și ar fi condiționate monogenetic. În cea de a opta decadă incidența diabetului zaharat, la bărbați, este de 2—3%, iar la femei de 2—6%, ceea ce înseamnă că 4—9% din populația de această vîrstă are diabet clinic. După unele statistici, desigur incomplete, frecvența diabetului (clinic) zaharat este în continuă creștere și se apreciază că numărul diabeticilor este „mult mai mare în prezent decît în urmă cu cîteva decenii" (M a x i m i l i a n, 1972).

N e e l emite în 1962 o interesantă ipoteză privind geneza diabetului zaharat, bazată pe observațiile sale făcute asupra șobolanilor de nisip din pustiul Arabiei : în condiții normale de viață, care sînt aspre (lipsa de hrană, subnutriție permanentă, căutarea îndelungată a hranei) nu fac diabet, dar în condiții de alimentație abundentă — da. N e e l, și după el alți numeroși cercetători, înclină să creadă că apariția și dezvoltarea stării de diabet sînt condiționate de potențialul limitat al pancreasului : cînd pancreasul este suprasolicitat — hrană abundentă, fumatul, stressurile zilnice, obezitatea etc. — cedează datorită „incapacității genotipului uman" de a se adapta perfect la condițiile nou create.

După opinia lui A s s a n (1973) insulina ar juca un rol foarte important în mecanismele de reglare a adaptării organismului la inaniție controlînd procesele de lipoliză și eliberarea unor aminoacizi la nivelul țesutului muscular.

Diabetul a fost descris și la numeroase animale de laborator (iepuri, șoareci, șobolani, hamsterul chinezesc — *Cricetulus griseus*, șoarecele de nisip din Sahara — *Pasmmomys obesus* — diferite tipuri de șoareci de la-

borator care fac diabet spontan), la unele animale domestice (pisica, cîinele, calul, porcul, oaia, capra) la care frecvența diabetului spontan este relativ neînsemnată (1,25—5%). Păsările domestice nu fac diabet spontan (Pavel, Sdrobici, Pieptea, 1974).

În diabetul provocat prin insuficiența insulinei modificările hormonale și metabolice sînt de ordin secundar, hiperglicemia diabetică datorîndu-se pe de o parte unei scăzute utilizări a glucozei în țesuturile periferice, iar pe de altă parte, unei eliberări mai mari de glucoză de către ficat. Glucopenia — utilizarea redusă a glucozei celulare, neoglucogeneza, creșterea catabolismului azotat și o lipemie mărită sînt după unii autori cauzate de o insuficiență accentuată în insulină și sînt fenomene secundare, ca dealtfel și hipersecreția unor hormoni — glucagonul, STH, catecolaminele și cortizonul.

Unele medicamente, de exemplu diamidina, cortizonul, salureticele de tipul clorotiazidei, hidrotiazidei, izoindolinei au uneori drept efect apariția diabetului ca urmare a sărăcirii organismului în potasiu, a scăderii toleranței față de glucide, a inhibiției efectului insulinotrop al glucozei, glucagonului și leucinei. Alte substanțe din categoria tiazidelor, benzotiadiazinelor (diazoxidul), contraceptivele sînt agenți diabetogeni cunoscuți sau în cazul ultimelor sînt incriminate ca diabetogene (Sdrobici și Dumitrescu, 1965; Pavel, Sdrobici și Pieptea, 1974).

Efectul diabetogen al hormonului somatotrop se manifestă prin acțiunea lui stimulatoare asupra celulelor α-glucagon-formatoare (acțiunea pancreatrop glucagon-formatoare), cît și asupra celulelor β din insulele lui Langerhans, care secretă insulină și pe care le inhibă. Prin antagonism cu insulina, hormonul somatotrop determină o stare hiperglicemică, precedată de o stare de hipoglicemie acută și însoțită de creșterea concentrației acizilor grași și a corpilor cetonici. Starea hiperglicemică se datorește stimulării de către hormonul de creștere a secreției de glucagon.

Vasopresina și ocitocina restabilesc activitatea enzimatică a hexokinazei izolată din drojdii după inhibiția acesteia în prezența hormonilor glucocorticoizi, ceea ce denotă și o altă posibilitate de participare a acestor doi hormoni la reglarea metabolismului glucidic (Titova, 1966).

Apariția stării de *diabet insipid* este, de regulă, o urmare a proceselor patologice din hipotalamus. Diabetul insipid a fost obținut experimental la șobolani, cîine, pisică și maimuță prin leziuni hipotalamice în care tractul supraopticohipofizal este întrerupt și are loc o degenerare a nucleului supraoptic.

Hormonul somatotrop administrat subiecților nediabetici hipofizectomizați (10 mg STH — intramuscular, la interval de două zile) s-a dovedit a produce o stare diabetică asemănătoare cu cea obținută pe animale inferioare (Ikkos și Luft, 1960) denumită *diabet idiohipofizeal*, caracterizat prin micșorarea toleranței la încărcarea cu glucoză, hiperglicemie, glucozurie, cetonurie ocazională, retenție de azot, stări care dispar la încetarea injectării de STH. Luft și Cerasi (1964) au arătat că diabetul ideohipofizeal, declanșat de administrarea de STH, este însoțit la om, în testul încărcării cu glucoză, de hiperinsulinism, ceea ce pare la prima vedere un paradox.

Luft și Cerasi (1964) au arătat primii că administrarea cronică timp de 3—4 zile de hormon somatotrop determină la om o intoleranță față de glucide și o puternică stimulare a secreției de insulină, ultima fiind probabil un fenomen secundar de adaptare a organismului. Ulterior, Cerasi și Luft (1973) au arătat că efectul STH asupra insulinei variază în timp — la început o inhibiție, apoi o stimulare și ulterior o inhibiție mult mai puternică, în timp ce toleranța organismului față de glucide scade permanent.

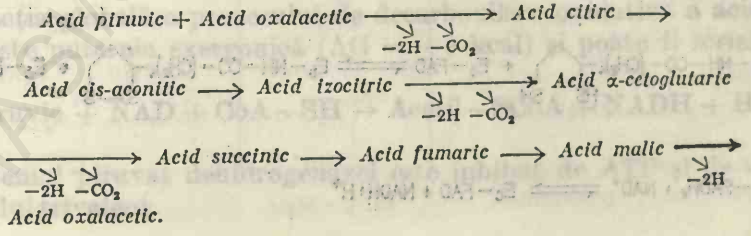
Hormonii tiroidieni acționează asupra metabolismului glucidic prin creșterea absorbției monozaharidelor la nivelul intestinului, iar în funcție de concentrația lor prin accelerarea sau inhibarea glicolizei; dozele mari de tiroxină stimulează gliconeogeneza din proteine și din lipide, iar țesutul muscular și adipos au o capacitate mai mare de reținere a glucozei. În general, efectul hormonilor tiroidieni asupra metabolismului glucidelor nu poate fi analizat separat de efectul altor hormoni — catecolaminele, insulina și glucagonul.

15

CICLUL ACIZILOR TRICARBOXILICI

Respirația celulară se caracterizează prin *procese aerobe* care constau *într-un transfer de electroni de la diferiți componenți organici*, produși ai metabolismului intermediar, *la oxigenul molecular*. Electronii transportați în catena respiratorie (v. cap. 16) rezultă în *ciclul acizilor tricarboxilici* denumit și *ciclul acidului citric* sau *ciclul lui* K r e b s. Acesta reprezintă un fel de *placă turnantă a metabolismului* în care acetil ~ SCoA rezultată în procesele de degradare a glucidelor, lipidelor și protidelor este transformată pînă la formarea de dioxid de carbon și hidrogen. *Compușii ciclului* K r e b s *îndeplinesc roluri deosebit de importante în anabolismul aminoacizilor, purinelor, pirimidinelor, acizilor grași și porfirinelor.*

Cercetările întreprinse de T h u n b e r g (1912—1920), B a t e l l i și S t e r n la începutul secolului nostru și continuate de M a r t i u s și K n o o p au arătat că numeroși acizi mono-, di- și tricarboxilici pot fi oxidați de țesuturile animale (omogenate, secțiuni de țesuturi, extracte tisulare, fracții subcelulare), dar numai patru acizi — citric, succinic, fumaric și malic — sînt metabolizați intens. Din aceste observații s-a născut ipoteza că acești acizi pot îndeplini un rol intermediar în metabolismul lipidelor și glucidelor. K r e b s (1937) demonstrează că acidul citirc se poate forma, în cordul de porumbel, din acidul piruvic și acidul oxalacetic și presupune că oxidarea completă a piruvatului pînă la formarea a trei molecule de CO_2 poate să decurgă în felul următor :

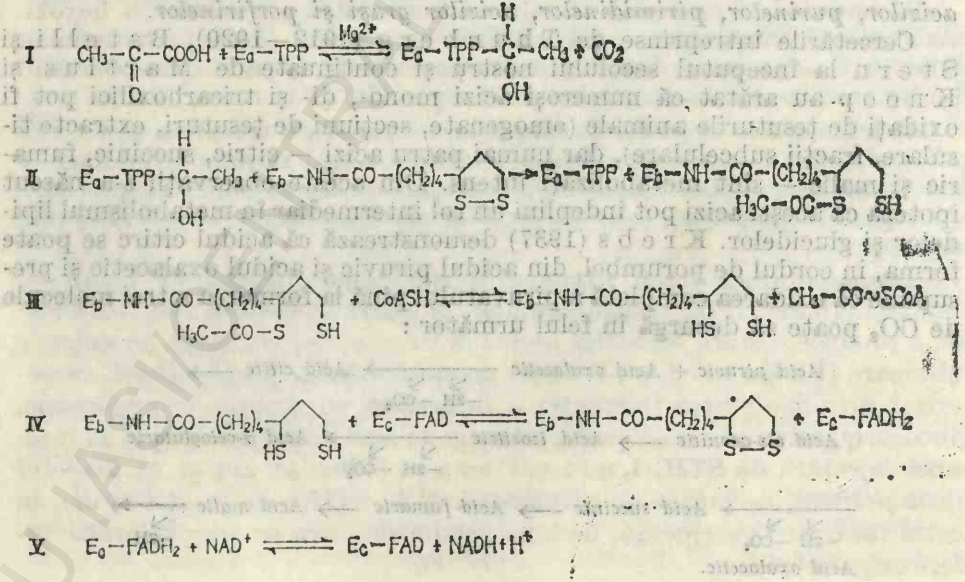


40 — c. 636

Cercetările ulterioare au adus numeroase și incontestabile date experimentale care au demonstrat că ciclul acizilor tricarboxilici este prezent în țesuturile tuturor animalelor, iar după 1948 Green, Potter și Lehninger au arătat că și enzimele care-l catalizează sînt localizate în formațiunile infracelulare denumite *mitocondrii*. După descoperirea coenzimei *A* de către F. Lipmann (1950) s-a constatat că de fapt în procesul de formare a acidului citric este folosit nu acidul piruvic, ci acidul acetic sub forma sa activată de acetil ~ SCoA.

Procesul degradării acetil ~ SCoA în ciclul acizilor tricarboxilici este ciclic (nu liniar ca procesul glicolizei) și începe cu o condensare de tip aldolic a acetil ~ SCoA cu acidul oxalilacetic, rezultînd un acid cu șase atomi de C — acidul citric. Acetil ~ SCoA poate rezulta în celulă în urma proceselor de degradare a aminoacizilor (cap. 19), a acizilor grași superiori (cap. 17) și din acidul piruvic provenit din degradarea glucidelor (cap. 14).

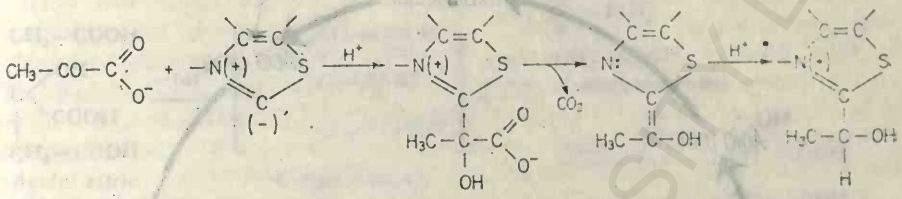
Piruvatul poate suferi un proces de decarboxilare oxidativă cu formarea acetil coenzimei *A*, catalizat de un sistem multienzimatic numit *piruvat dehidrogenaza* — constituit din trei enzime distincte: E_a — piruvat dehidrogenaza; E_b — dihidrolipoat transacetilaza și E_c dihidrolipoat dehidrogenaza. Decarboxilarea oxidativă a piruvatului cu formare de acetilcoenzimă *A* decurge în cinci etape:



și poate fi descris de reacția totală :

$$CH_3-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-COOH + NAD^+ + CoASH \longrightarrow CH_3-CO-SCoA + CO_2 + NADH + H^+$$

care este ireversibilă. Într-o primă etapă, catalizată de piruvat dehidrogenaza, are loc adiția tiaminpirofosfat enzimei la gruparea carbonil a piruvatului cu formarea unui complex covalent enzimă-substrat care decarboxilează spontan :



Acest 2-hidroxietil derivat este considerat ca o formă activă a aldehidei acetice. În etapa a doua, gruparea hidroxietil este transferată la un atom de sulf din structura acidului lipoic, având loc oxidarea grupării hidroxietil și reducerea acidului lipoic. Acesta din urmă este legat covalent în structura dihidrolipoat transacetilazei prin intermediul unei legături amidice stabilite între gruparea carboxil a grupării prostetice și gruparea ε-amino a unui rest de lizină din structura apoenzimei. În a treia etapă, catalizată de transacetilază, are loc transferul grupării acetil de la lipoilenzimă la coenzima *A* cu formarea produsului final — acetil coenzima *A*. Urmează reoxidarea acidului lipoic redus prin intermediul dihidrolipoat dehidrogenazei care conține doi moli de FAD legați la un mol enzimă. În final, $FADH_2$ este reoxidat de acceptorul de hidrogen — NAD^+.

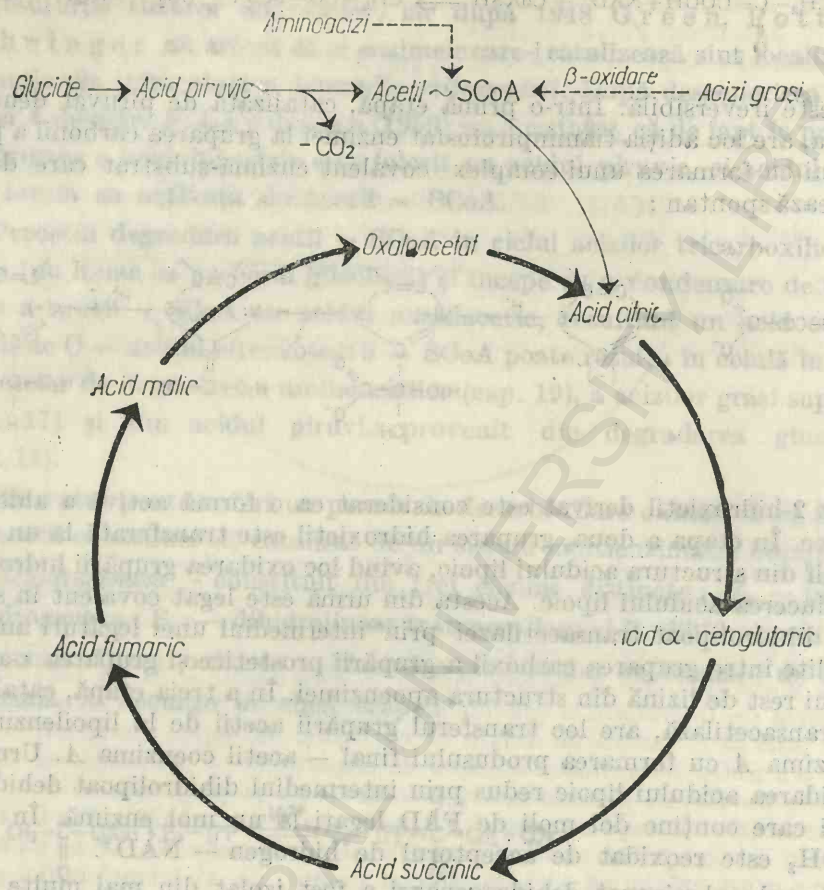
Complexul piruvat dehidrogenazei a fost izolat din mai multe surse biologice. Preparatul purificat din *E. coli* conține 24 molecule de piruvat dehidrogenază (fiecare moleculă are o masă de 90 000 și are o moleculă de TPP), o moleculă de dihidrolipoat transacetilază (cu o structură cuaternară constituită din 24 catene polipeptidice, fiecare având o masă moleculară de 36 000 și câte o moleculă de acid lipoic) și 12 molecule de dihidrolipoat dehidrogenază (fiecare având o masă moleculară de 55 000 și câte o moleculă FAD).

Reacția globală a procesului de decarboxilare oxidativă a acidului piruvic este puternic exergonică ($\Delta G = -8$ kcal) și poate fi scrisă astfel :

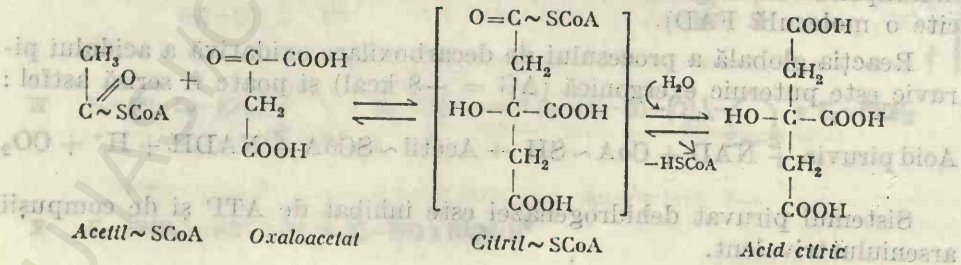
$$\text{Acid piruvic} + NAD + CoA \sim SH \rightarrow \text{Acetil} \sim SCoA + NADH + H^+ + CO_2$$

Sistemul piruvat dehidrogenazei este inhibat de ATP și de compușii arseniului trivalent.

Schematic sursele de acetil~SCoA şi legătura lor cu ciclul acizilor tricarboxilici pot fi redate astfel:



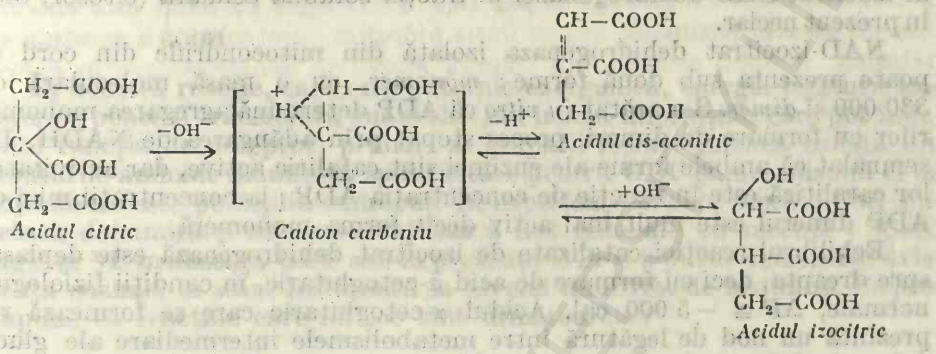
Prima reacţie în ciclul acizilor tricarboxilici constă într-o condensare a acetil~SCoA cu oxaloacetatul cu formare de acid citric. Această reacţie este catalizată de *citrat sintază*, denumită şi „enzimă de condensare", şi este o reacţie puternic exergonică ($\Delta G = -7{,}7$ kcal) echilibrul fiind deplasat spre dreapta:



Citrat sintaza este o enzimă reglatoare activată de prezența în mediu a ionilor de Mg^{2+} și inhibată de ATP în cazul majorității organismelor vii; la *E. coli* este inhibată de NAD redus. Energia degajată în cursul acestei reacții provine din legătura tioesterică a citril ~ SCoA, compus instabil care prin hidroliză trece în acid citric.

Acidul citric astfel format se izomerizează sub acțiunea aconitazei, stabilindu-se un echilibru la 91% acid citric, 6% acid izocitric și 3% acid *cis*-aconitic.

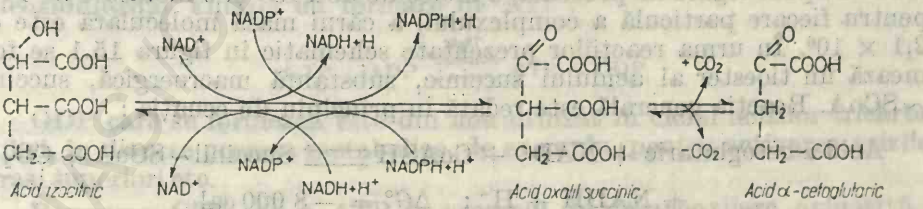
Se formează, probabil, un cation intermediar de carbeniu, care constituie etapa intermediară între cei trei acizi *.



Enzima aconitaza este puternic inhibată de acidul monoflor-acetic, care condensîndu-se sub formă de monofloracetilcoenzima *A* cu acidul oxalilacetic trece în *acid monofluorcitric* inhibitor puternic al aconitazei. Dovezi în acest sens au fost aduse de cercetările care au explicat moartea unor animale care consumau o plantă africană *(Dichapelum cymosum)* conținînd acid floracetic, prin inhibarea ciclului K r e b s la nivelul creierului. Inhibarea acestui proces are ca urmare încetinirea sub limita admisă a proceselor generatoare de energie necesare funcționării celulei nervoase. Aconitaza necesită pentru acțiunea ei prezența ionilor Fe^{2+} în mediul de reacție, deși aceștia pot forma complecși chelatici stabili cu acidul citric.

Acidul izocitric participă la echilibrul descris mai sus doar în proporție de 6%. Fiind însă componenta care este în permanență consumată în fazele următoare ale ciclului K r e b s, echilibrul este deplasat spre formarea de noi cantități de acid izocitric.

Acidul izocitric este în continuare dehidrogenat sub influența *NAD-izocitricdehidrogenazei*, cu formarea de acid oxalilsuccinic, care însă nu este pus în libertate din complexul enzimă-substrat, ci este decarboxilat la *acid α-cetoglutaric*:



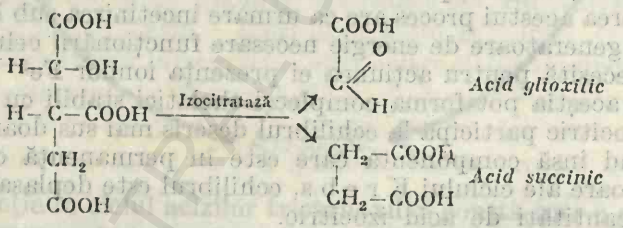
* Atomul de H este considerat delocalizat, avînd o poziție intermediară între cei doi atomi de carbon.

Din țesuturile animale și vegetale precum și de la microorganisme au fost izolate două tipuri de izocitrat dehidrogenaze mitocondriale: unul care necesită NAD^+ ca acceptor de electroni și altul care necesită $NADP^+$. Izocitrat dehidrogenaza cu $NADP^+$ este prezentă și în citoplasmă și este activată de ionii de Mg^{2+}. Enzimele sînt activate specific printr-un mecanism allosteric de ADP și necesită pentru activitatea lor ioni de Mg^{2+} și Mn^{2+}. Activarea allosterică prin ADP determină o creștere a afinității enzimei față de substratul ei. ATP și NADH inhibă izocitrat dehidrogenazele după mecanismul inhibiției competitive cu NAD^+. Rolul fiziologic al izocitrat-NAD-dehidrogenazei în fracția solubilă celulară (citosol) este în prezent neclar.

NAD-izocitrat dehidrogenaza izolată din mitocondriile din cord se poate prezenta sub două forme: *monomer*, cu o masă moleculară de 330 000 și *dimer*. S-a arătat *in vitro* că ADP determină agregarea monomerilor cu formare de dimeri, proces stopat prin adăugarea de NADH. De semnalat că ambele forme ale enzimei sînt catalitic active, dar activitatea lor catalitică este în funcție de concentrația ADP: la concentrații mici de ADP dimerul este mult mai activ decît forma monomeră.

Echilibrul reacției catalizate de izocitrat dehidrogenază este deplasat spre dreapta, deci cu formare de acid α-cetoglutaric, în condiții fiziologice normale, $\Delta F \cong -5\,000$ cal. Acidul α-cetoglutaric care se formează reprezintă un nod de legătură între metabolismele intermediare ale glucidelor, lipidelor și ale unor aminoacizi, deoarece reprezintă un precursor potențial (prin transaminare sau prin oxidare) al numeroșilor metaboliți intermediari.

La unele microorganisme acidul izocitric nu este metabolizat cu formare de acid α-cetoglutaric ci este scindat, prin inversarea unei reacții de tipul condensării aldolice, dînd naștere la acid succinic și acid glioxilic:

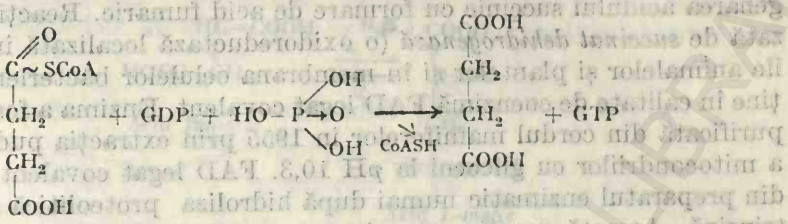


La organismele heterotrofe acidul α-cetoglutaric este decarboxilat oxidativ cu formare de acid succinic. Această reacție este catalizată de complexul enzimatic al α-cetoglutarat dehidrogenazei, care conține șase molecule de lipoat legate de proteină, 8 molecule de FAD și 6 molecule de TPP pentru fiecare particulă a complexului, a cărui masă moleculară este de $2{,}1 \times 10^6$. În urma reacțiilor prezentate schematic în figura 15.1 se formează un tioester al acidului succinic, substanță macroergică, succinil ~SCoA. Reacția generală este redată în principiu de ecuația:

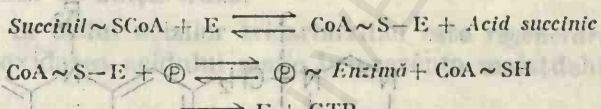
$$\text{Acid } \alpha\text{-cetoglutaric} + NAD^+ + \text{CoASH} \rightleftharpoons \text{Succinil} \sim \text{SCoA} + CO_2 + NADH + H^+; \quad \Delta G^\circ = -8\,000 \text{ cal}$$

Succinil~SCoA care se formează este utilizată în celulă și pentru sinteza porfirinei, dar cea mai mare parte este transformată în continuare în

acid succinic în cursul unei reacții în care energia legăturii tioesterice este acumulată în celulă sub forma unei legături macroergice în acidul GTP. Reacția este catalizată de *succinil-CoA-sintetaza* în prezența GDP și fosfatului:

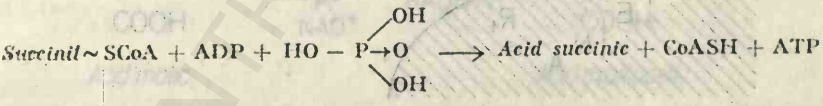


În această reacție, care este puternic exergonică, energia legăturii tioesterice poate fi transferată guanozin- sau inozin-difosfaților care pot îndeplini funcția de acceptori primari ai grupării fosfat. Enzima izolată din țesuturile animale manifestă specificitate pentru GDP și mecanismul ei de acțiune nu este pe deplin cunoscut. În experiențe în care succinil-CoA-sintetaza denumită și succinil-tiokinaza a fost incubată cu succinil ~ SCoA, Mg^{2+} și ^{32}P în absența GDP sau în prezența GTP s-a putut demonstra existența enzimei în stare fosforilată la nivelul unui rest de histidină. Se presupune că reacțiile care au loc sînt următoarele:

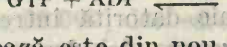


și că restul histidinic al enzimei este fosforilat cu formare de 3-fosfohistidină și aceasta constituie sursa care transferă gruparea fosfat de la enzimă la GDP.

La plante transferul energiei de la succinil ~ SCoA la un acceptor primar al grupării fosfat se realizează în cursul unei reacții catalizate tot de succinil CoA sintetază (izolată în laborator din frunzele de spanac) dar pe ADP:



De fapt procesul final este identic, deoarece GTP care se formează în cursul acestei reacții transferă gruparea fosfat la ADP sub acțiunea nucleoziddifosfat kinazei cu formare de ATP:

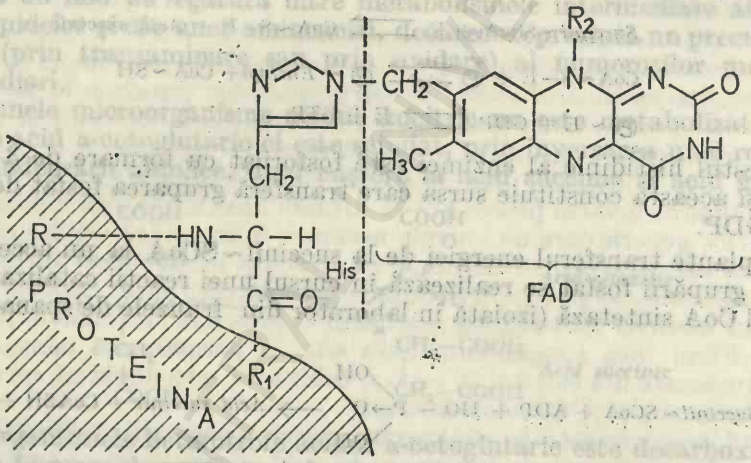


GDP care se formează este din nou utilizat în ciclul acizilor tricarboxilici, în diverse procese metabolice, de exemplu, pentru activarea acizilor grași superiori etc.

Formarea GTP sau a ATP în procesul de decarboxilare oxidativă a acidului α-cetoglutaric în cadrul reacțiilor de mai sus nu este blocată de inhibitorii sau de agenții decuplanți specifici fosforilării oxidative (v. cap.

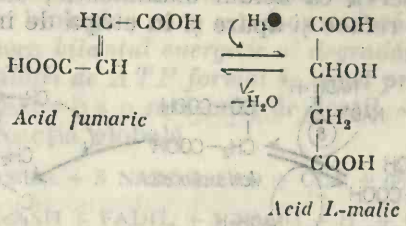
16) și este de fapt o reacție de *fosforilare oxidativă la nivelul substratului* și este singura reacție de acest fel din ciclul acizilor tricarboxilici.

Următoarea etapă în ciclul acizilor tricarboxilici o constituie dehidrogenarea acidului succinic cu formare de acid fumaric. Reacția este catalizată de *succinat dehidrogenază* (o oxidoreductază localizată în mitocondriile animalelor și plantelor și în membrana celulelor bacteriene), care conține în calitate de coenzimă FAD legat covalent. Enzima a fost prima dată purificată din cordul mamiferelor în 1955 prin extracția pudrei acetonice a mitocondriilor cu glicocol la *p*H 10,3. FAD legat covalent este eliberat din preparatul enzimatic numai după hidroliza proteolitică a acestuia cu tripsină. Această reacție este singura etapă de dehidrogenare în cadrul ciclului K r e b s în care acceptorul de hidrogen nu mai este reprezentat de nucleotidele pirimidinice NAD sau NADP. Succinat dehidrogenaza izolată din cordul vertebratelor are o masă moleculară de 97 000 și este alcătuită din două subunități inegale una cu o masă moleculară de 70 000, alta de 27 000, conțin patru atomi de Fe neheminic și patru atomi de sulf acido-labil (prin acidifiere formează H_2S). FAD este legat covalent de apoenzimă prin intermediul unui rest de histidină:



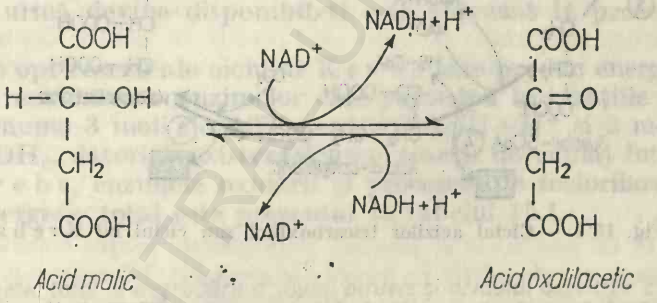
Reacția de dehidrogenare a acidului succinic cu formare de acid fumaric este stereospecifică pentru formele *trans*; izomerul *cis*—acidul maleic—nu se formează în cursul acestei reacții enzimatice. Acidul malonic este un inhibitor competitiv al enzimei și prezența lui în concentrații mari determină acumularea acidului succinic datorită întreruperii ciclului acizilor tricarboxilici. Succinat dehidrogenaza dehidrogenează *L*-clorosuccinatul și este indiferentă față de *D*-clorosuccinat, posedînd, de asemenea, și proprietăți specifice enzimelor alosterice: este activată de acidul succinic, acidul fumaric, de fosfat și este inhibată competitiv de acidul oxalilacetic. Inhibiția provocată de acest acid este mai puternică decît cea determinată de acidul malonic.

Acidul fumaric format în cursul reacției descrise este hidratat cu formare de acid malic în cursul unei reacții catalizate de *fumarază* denumită și *fumarat hidratază* :



Fumaraza a fost izolată din inima de porc și s-a dovedit că este o enzimă alcătuită din patru subunități polipeptidice identice, fiecare cu o masă moleculară de 48 000, fiecare unitate avînd trei grupări sulfhidril libere, care în stare separată sînt inactive catalitic. Fumaraza este o enzimă stereospecifică, deoarece în cursul reacției catalizate se formează numai acid *L*-malic, ceea ce demonstrează că adiționarea și îndepărtarea elementelor apei la/de la dubla legătură a acidului fumaric se face printr-un mecanism de adiție *trans*.

Ultima etapă în ciclul acizilor tricarboxilici este *regenerarea acidului oxalilacetic* prin oxidarea acidului malic în prezența malatdehidrogenazei și NAD :



reacția fiind endergonică ($\Delta G^\circ = 7\ 100$ cal) și deplasată spre dreapta din cauză că acidul oxalilacetic este consumat în celulă. Malat dehidrogenaza este o enzimă care la animalele superioare este distribuită atît în mitocondrii cît și în citoplasmă. Enzima izolată de la diferite specii are aceeași masă moleculară (aprox. 66 000) dar este deosebită din punct de vedere al compoziției în aminoacizi, al mobilității electroforetice și a proprietăților cinetice. Din mitocondrii au fost izolate cinci forme multiple (izoenzime sau izozime) ale malat dehidrogenazei identice din punct de vedere al proprietăților catalitice, dar diferite sub raportul conformației moleculare.

Rezumativ și schematic, ciclul acizilor tricarboxilici este redat în figura 15.1.

Analizînd ansamblul reacțiilor care au loc în decursul ciclului acizilor tricarboxilici, se observă că acidul oxalilacetic, compusul inițial de la care începe ciclul, se reface și apare și în etapa de închidere a ciclului. Se

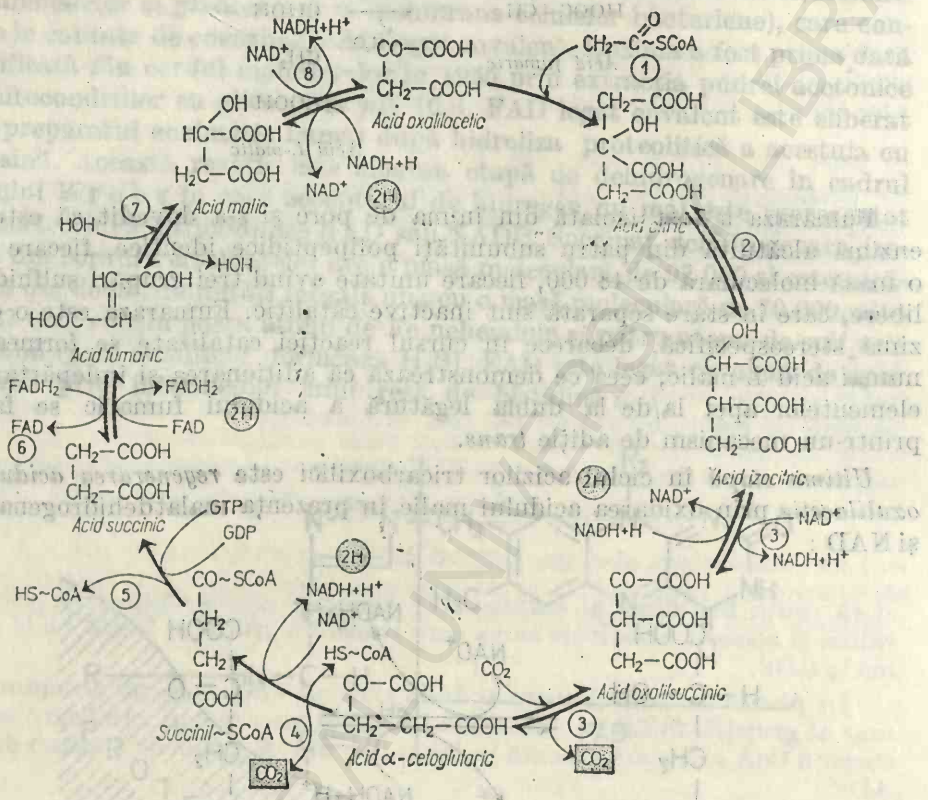


Fig. 15.1. — Ciclul acizilor tricarboxilici sau ciclul lui Krebs.

evidențiază deci faptul că rezultatul tuturor transformărilor care au loc odată cu parcurgerea ciclului de opt reacții este consumarea unei molecule de acid acetic (care reacționează în reacția *1* cu acidul oxalilacetic spre a genera acidul citric), care dă naștere la două molecule de dioxid de carbon (reacțiile *3* și *4*) și la opt atomi de hidrogen (reacțiile *3*, *4*, *6* și *8*):

$$CH_3-COOH + 2H_2O \longrightarrow 2CO_2 + 8H$$

Dioxidul de carbon care se formează în ciclul Krebs este eliminat prin expirație la nivelul plămînilor cu ajutorul hemoglobinei, iar cei opt atomi de hidrogen sînt preluați de acceptorii de hidrogen (NAD și FAD) și prin intermediul catenei de oxidare celulară (v. cap. 16) reacționează cu O^{2-} dînd naștere moleculelor de apă.

15.1 BILANȚUL ENERGETIC AL CICLULUI K R E B S

Organismele pot stoca și valorifica ulterior doar acea parte a energiei rezultată din oxidările biologice care este acumulată în legăturile macroergice ale ATP. De aceea *bilanțul energetic al degradării aerobe a glucidelor constă în calculul cantității de ATP format în acest proces oxidativ.*

În cursul ciclului K r e b s o moleculă de acetil ~ SCoA a fost degradată complet, după reacția globală

$$CH_3-CO\sim SCoA + 3\ NAD^+ + FAD + GDP + Ⓟ + 3\ H_2O \rightarrow$$
$$2\ CO_2 + CoASH + FADH_2 + 3\ NADH + H^+ + GTP$$

în urma căreia rezultă opt echivalenți de reducere înglobați în structura coenzimelor transportoare de hidrogen (o moleculă de $FADH_2$ și trei molecule de $NADH+H^+$) care prin intermediul componentelor catenei respiratorii ajung la oxigen cu care se combină. Bilanțul global al reacțiilor de oxidoreducere va fi:

$$CH_3-COOH + 2\ O_2 \longrightarrow 2\ CO_2 + 2\ H_2O$$

În acest calcul trebuie luată în considerare nu numai energia procurată prin oxidarea celor opt otomi de hidrogen proveniți din oxidarea acidului acetic pe parcursul reacțiilor care constituie ciclul lui K r e b s, ci și energia rezultată pe parcursul glicolizei, știut fiind faptul că degradarea aerobă a glucidelor reprezintă continuarea degradării anaerobe prin utilizarea acidului piruvic produs al acestei degradări. Datorită faptului că acidul piruvic nu mai este redus la acid lactic cu ajutorul NADH, acesta din urmă devine disponibil și este antrenat în procesul oxidării terminale.

Din cele opt reacții ale ciclului K r e b s șase produc energie în mediu aerob prin reoxidarea coenzimelor care participă la reacțiile de dehidrogenare și anume 3 moli de ATP pentru $NADH+H^+$ și 2 moli de ATP pentru $FADH_2$, datorită existenței unor reacții de cuplaj între enzimele ciclului K r e b s, enzimele oxidării și procesele de fosforilare oxidativă. Bilanțul energetic total este prezentat în tabelul 15.1.

TABELUL 15.1

Bilanțul energetic total al degradării acidului piruvic și acidului acetic în ciclul K r e b s

Reacția	*Coenzima sau acceptorul de grupări fosfat*	*ATP format în urma oxidării complete*
Acid piruvic→Acetil ~SCoA	NAD	3
Acetil~SCoA→Acid citric→Acid izocitric→Acid α-cetoglutaric.	NAD	3
Acid α-cetoglutaric→Succinil~SCoA	NAD	3
Succinil~SCoA→Acid succinic	GDP	1
Acid succinic→Acid fumaric	FAD	2
Acid malic→Acid oxalilacetic	NAD	3
Total mol ATP plecînd de la acidul piruvic		15
Total mol ATP plecînd de la acetil~SCoA		12

Oxidarea completă a acidului acetic în bomba calorimetrică pune în libertate 209 000 calorii. Prin degradarea lui biologică se formează 12 moli ATP și deci se recuperează 12 × 8 000 = 96 000, ceea ce corespunde la un randament de 45%.

15.2 RĂSPÎNDIREA CICLULUI K R E B S ÎN LUMEA VIE

Ciclul lui K r e b s este *localizat în mitocondrii și a fost descris* la început *în mușchii striați*, în mușchiul cardiac de porumbel, în ficatul de porumbel, iar ulterior s-a dovedit că toate țesuturile animale de la protozoare pînă la vertebrate sînt capabile să degradeze piruvatul și acidul acetic via ciclul acizilor tricarboxilici.

La microorganisme prezența ciclului K r e b s a fost semnalată în 1942 de către L y n e n și a fost demonstrată fără echivoc în 1948 cu ajutorul izotopilor radioactivi ca o cale terminală a oxidării acetatului de către microorganisme.

G r e e n b e r g (1960) admite că *unele bacterii fotosintetizante* pot constitui *excepții de la această regulă.*

La *drojdii și la numeroase bacterii au fost evidențiate* numeroase *etape intermediare ale ciclului* K r e b s sau ale oxidării acetatului, dar dificultăți experimentale legate de bariera de permeabilitate care separă metaboliții interni de metaboliții externi eliminați în mediul de cultură fac laborioasă demonstrarea prezenței ciclului K r e b s. În ultimul deceniu s-a dezvoltat mult conceptul de „enzime transportoare" sau „permeaze" conform căruia pătrunderea unor metaboliți în celulă depinde de prezența unor proteine specifice care acționează ca agenți de transport contra unui gradient de concentrații. Numeroase mucegaiuri (*Aspergillus niger, Neurospora crassa, Streptomyces griseus, S. nitrificans* etc.) pot sintetiza acid citric prin condensarea acidului oxalilacetic cu acetatul activat sub formă de acetil ~ SCoA.

Ciclul K r e b s *la plante* a fost semnalat prima dată de T h u n b e r g care a arătat că *semințele și polenul unor plante conțin seturi de dehidrogenaze similare cu cele găsite în țesuturile animale.* Ulterior s-a demonstrat că *intermediarii ciclului* K r e b s *sînt prezenți în toate celulele vegetale*, dar sînt rapid oxidați, iar malonatul constituie și în acest caz un inhibitor specific. Adăugarea produșilor intermediari ai ciclului K r e b s la secțiunile organelor de rezervă ale plantelor accelerează respirația acestora, iar introducerea de acid acetic și de acid piruvic, marcați cu ^{14}C conduce la apariția unor produși intermediari ai ciclului marcați, ceea ce denotă metabolizarea lor în plante. Cantitatea și succesiunea eliminării dioxidului de carbon marcat cu ^{14}C din CH_3-COOH și CH_3-CH_2-COOH corespund succesiunii reacțiilor din ciclul lui K r e b s. *În mitocondriile izolate din diferite surse vegetale au fost identificate toate stadiile ciclului lui* K r e b s, care au fost confirmate experimental și cu ajutorul acidului acetic și acidului piruvic marcați cu C radioactiv. S-a constatat, de asemenea, că la plante acidul malonic inhibă oxidarea acidului piruvic, determinînd o acumulare de acid succinic.

15.3 ROLUL CICLULUI KREBS ÎN CELULĂ

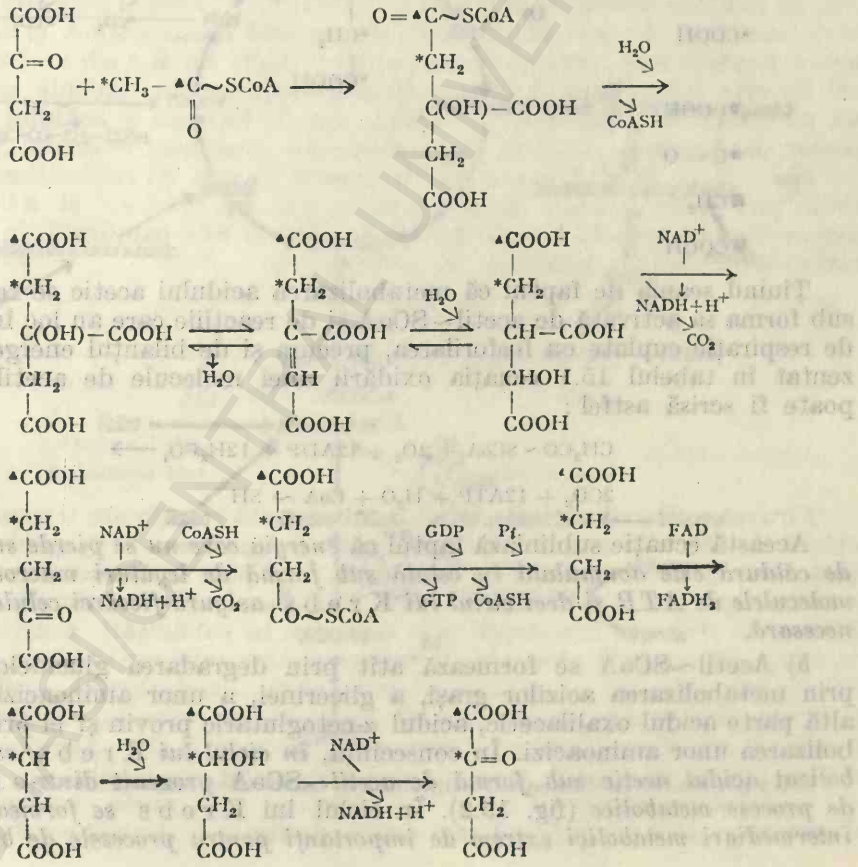
Analiza degradării aerobe a glucidelor pe calea ciclului Krebs conduce la două concluzii importante care subliniază rolul major al acestei căi metabolice :

a) *Ciclul lui* Krebs *joacă un rol deosebit de important în acumularea de energie în celulă pe baza reacțiilor exergonice de oxidare a cîte unei molecule de acid acetic cu ocazia parcurgerii fiecărui ciclu complet.*

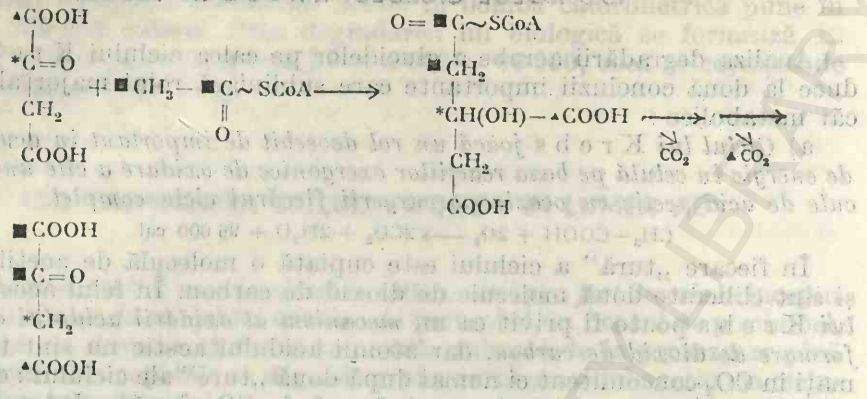
$$CH_3-COOH + 2O_2 \longrightarrow 2CO_2 + 2H_2O + 96\,000 \text{ cal.}$$

În fiecare „tură" a ciclului este cuplată o moleculă de acetil~SCoA și sînt eliberate două molecule de dioxid de carbon. În felul acesta *ciclul lui* Krebs poate fi privit ca un *mecanism al oxidării acidului acetic cu formare de dioxid de carbon*, dar atomii acidului acetic nu sînt transformați în CO_2 concomitent ci numai după două „ture" ale ciclului : carbonul grupării carboxil este eliminat sub formă de CO_2 după a doua „tură" a ciclului, iar C grupării metil — după cea de a treia „tură" a ciclului. Acest fapt poate fi ilustrat cu ajutorul următoarei scheme în care atomii de carbon ai acetatului sînt marcați diferit :

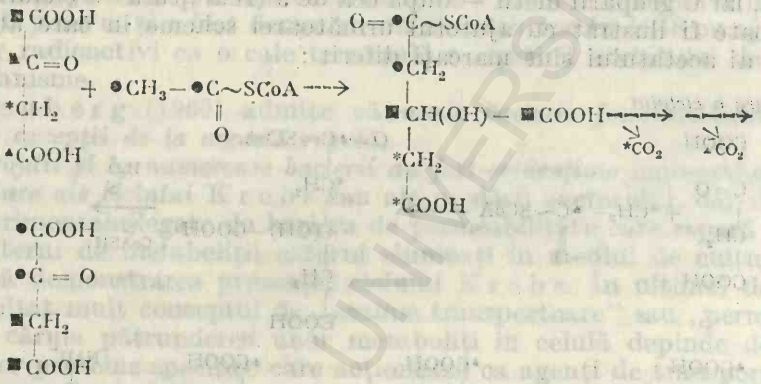
Prima tură a ciclului



A doua tură a ciclului



A treia tură a ciclului



Ținînd seama de faptul că metabolizarea acidului acetic se realizează sub forma sa activată de acetil~SCoA și de reacțiile care au loc în catena de respirație cuplate cu fosforilarea, precum și de bilanțul energetic prezentat în tabelul 15.1 ecuația oxidării unei molecule de acetil~SCoA poate fi scrisă astfel:

$$CH_3CO\sim SCoA + 2O_2 + 12ADP + 12H_3PO_4 \longrightarrow$$

$$2CO_2 + 12ATP + H_2O + CoA \sim SH$$

Această ecuație subliniază faptul că *energia care nu se pierde sub formă de căldură este acumulată în celulă sub formă de legături macroergice în moleculele de ATP și deci ciclul lui* Krebs *asigură fiecărei celule energia necesară.*

b) Acetil~SCoA se formează atît prin degradarea glucidelor cît și prin metabolizarea acizilor grași, a glicerinei, a unor aminoacizi. Pe de altă parte acidul oxalilacetic, acidul α-cetoglutaric provin și ei prin metabolizarea unor aminoacizi. În consecință, *în ciclul lui* Krebs *este metabolizat acidul acetic sub formă de acetil~SCoA provenit dintr-o varietate de procese metabolice* (fig. 15.2). În ciclul lui Krebs *se formează însă intermediari metabolici extrem de importanți pentru procesele de biosinteză*

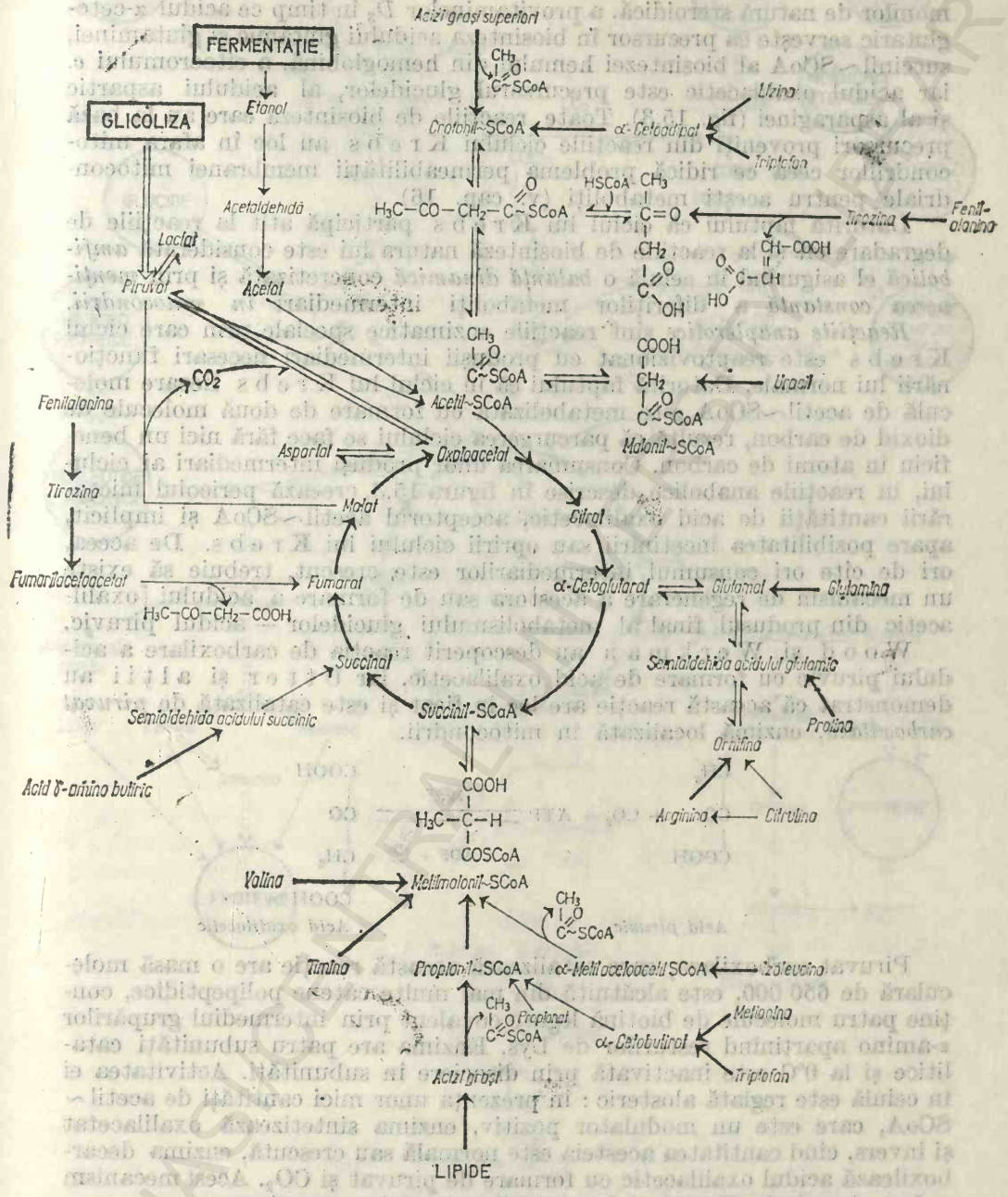


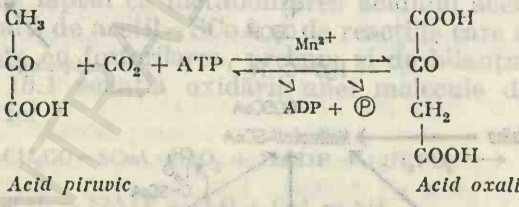
Fig. 15.2.— Sursele formării acetil~SCoA și a diferiților componenți ai ciclului K r e b s.

din celulă : din acidul piruvic se poate sintetiza alanina (v. cap. 19), acetil~SCoA este precursorul biosintezei acizilor graşi, colesterolului, hormonilor de natură steroidică, a provitaminelor D_3 în timp ce acidul α-cetoglutaric serveşte ca precursor în biosinteza acidului glutamic şi glutaminei, succinil~SCoA al biosintezei hemului din hemoglobină, a citocromului *c*, iar acidul oxalilacetic este precursorul glucidelor, al acidului aspartic şi al asparaginei (fig. 15.3). Toate reacţiile de biosinteză care au la bază precursori proveniţi din reacţiile ciclului Krebs au loc în afara mitocondriilor ceea ce ridică problema permeabilităţii membranei mitocondriale pentru aceşti metaboliţi (v. cap. 16).

Datorită faptului că ciclul lui Krebs participă atît la reacţiile de degradare cît şi la reacţiile de biosinteză natura lui este considerată *amfibolică* el asigurînd în celulă o *balanţă dinamică* concretizată şi prin *menţinerea constantă* a diferiţilor metaboliţi intermediari *în mitocondrii*.

Reacţiile anaplerotice sînt reacţiile enzimatice speciale prin care ciclul Krebs este reaprovizionat cu produşii intermediari necesari funcţionării lui normale. Datorită faptului că în ciclul lui Krebs fiecare moleculă de acetil~SCoA este metabolizată cu formare de două molecule de dioxid de carbon, rezultă că parcurgerea ciclului se face fără nici un beneficiu în atomi de carbon. Consumarea unor produşi intermediari ai ciclului, în reacţiile anabolice descrise în figura 15.3, creează pericolul micşorării cantităţii de acid oxalilacetic, acceptorul acetil~SCoA şi implicit, apare posibilitatea încetinirii sau opririi ciclului lui Krebs. De aceea, ori de cîte ori consumul intermediarilor este crescut, trebuie să existe un mecanism de regenerare a acestora sau de formare a acidului oxalilacetic din produsul final al metabolismului glucidelor — acidul piruvic.

Wood şi Werkman au descoperit reacţia de carboxilare a acidului piruvic cu formare de acid oxalilacetic, iar Utter şi alţii au demonstrat că această reacţie are loc în ficat şi este catalizată de *piruvat carboxilază*, enzimă localizată în mitocondrii.



Acid piruvic *Acid oxalilacetic*

Piruvat carboxilaza, care catalizează această reacţie are o masă moleculară de 650 000, este alcătuită din mai multe catene polipeptidice, conţine patru molecule de biotină legate covalent prin intermediul grupărilor ε-amino aparţinînd resturilor de Lys. Enzima are patru subunităţi catalitice şi la 0°C este inactivată prin disociere în subunităţi. Activitatea ei în celulă este reglată alosteric : în prezenţa unor mici cantităţi de acetil~SCoA, care este un modulator pozitiv, enzima sintetizează oxalilacetat şi invers, cînd cantitatea acesteia este normală sau crescută, enzima decarboxilează acidul oxalilacetic cu formare de piruvat şi CO_2. Acest mecanism a fost descris în ficatul şi în rinichii animalelor superioare.

La plante, reacţia Wood-Werkman are unele particularităţi, deoarece au fost identificate trei reacţii de fixare a dioxidului de carbon

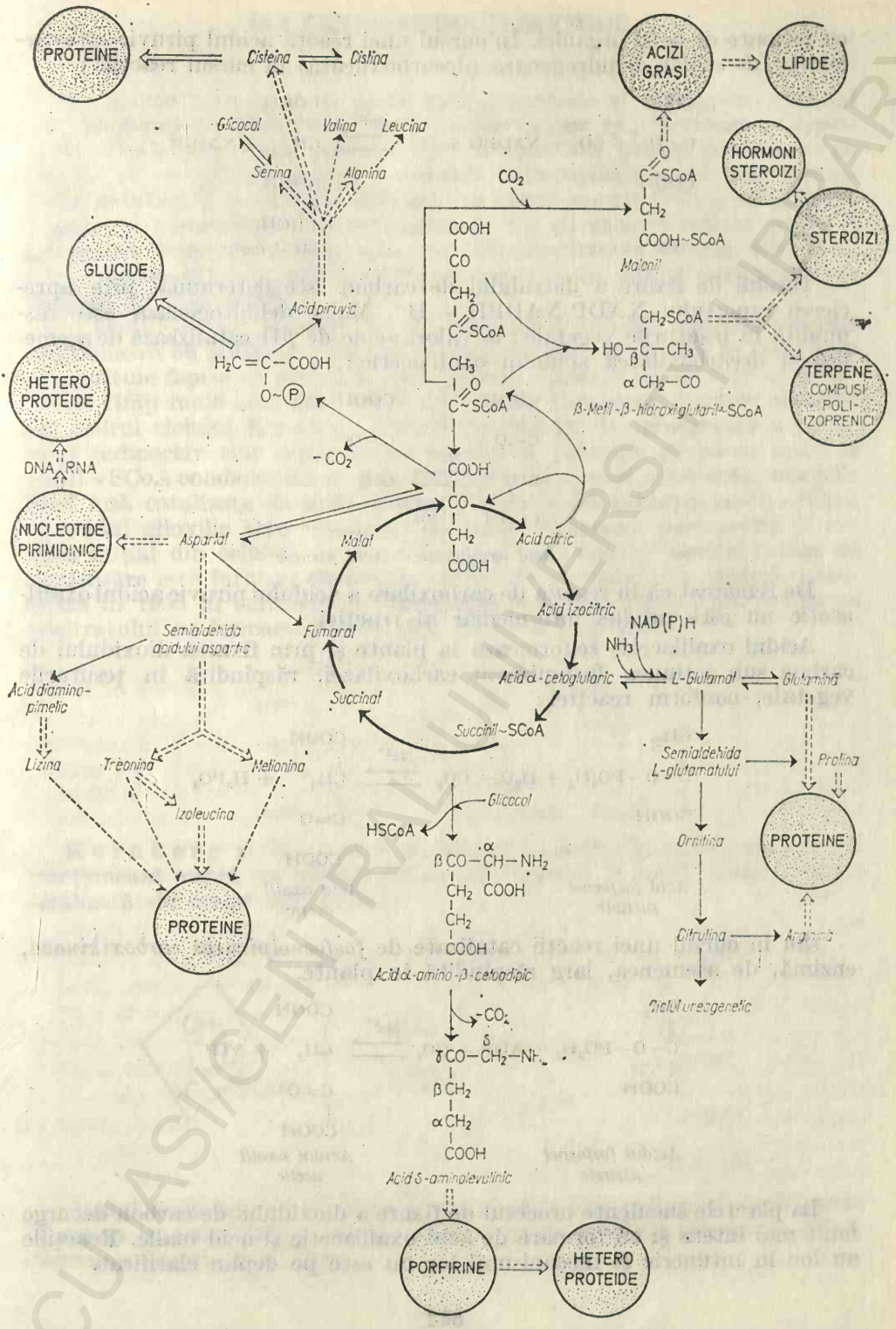
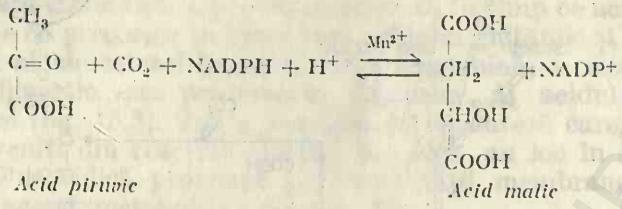


Fig. 15.3. — Legăturile dintre metabolismele proteinelor, glucidelor și lipidelor și ciclul K r e b s.

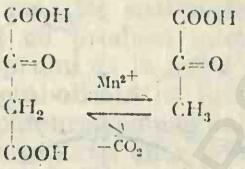
BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

cu formare de acizi organici. În cursul unei reacții acidul piruvic este carboxilat de malat dehidrogenază (decarboxilează) în cursul reacției :



Acid piruvic *Acid malic*

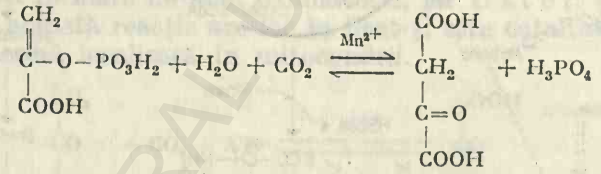
Gradul de fixare a dioxidului de carbon este determinat prin aprecierea raportului NADP/NADPH + H^+. Malat dehidrogenaza este răspîndită în țesuturile vegetale ; la valori acide de *p*H catalizează de asemenea și decarboxilarea acidului oxalilacetic :



Acid oxalilacetic *Acid piruvic*

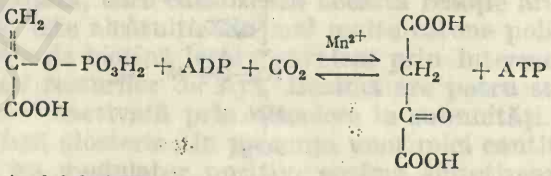
De remarcat că în reacția de carboxilare a acidului piruvic acidul oxalilacetic nu este produs intermediar al reacției.

Acidul oxalilacetic se formează la plante și prin fixarea dioxidului de carbon sub acțiunea fosfopiruvat carboxilazei, răspîndită în țesuturile vegetale, conform reacției :



Acid fosfoenol piruvic *Acid oxalil acetic*

sau în cursul unei reacții catalizate de *fosfoenolpiruvat carboxikinază*, enzimă, de asemenea, larg răspîndită în plante.



Acidul fosfoenol piruvic *Acidul oxalil acetic*

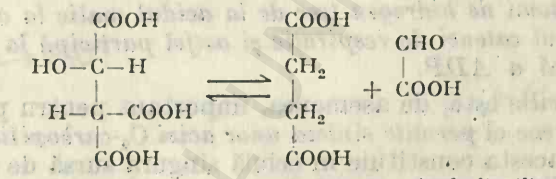
La plantele suculente procesul de fixare a dioxidului de carbon decurge mult mai intens și cu formare de acid oxalilacetic și acid malic. Reacțiile au loc în întuneric și mecanismul lor nu este pe deplin clarificat.

15.4 CICLUL ACIDULUI GLIOXILIC

La plante precum și la unele microorganisme și mucegaiuri (tulpini de *Pseudomonas, Escherichia coli, Saccharomyces sp., Aerobacter, Aspergillus, Penicillium* etc.) acetatul este utilizat atît pentru procurarea de energie cît și pentru sinteza catenelor hidrocarbonate ale unor constituenți celulari. Experiențele efectuate cu acetat marcat (^{14}C) și cu diferite tulpini de *Pseudomonas* au evidențiat faptul că atomul marcat poate fi incorporat rapid în diferiți compuși intermediari ai ciclului Krebs:

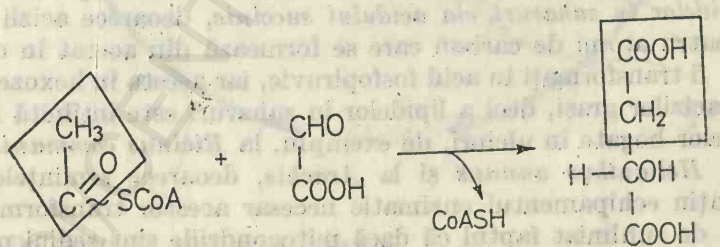
— acetil~SCoA marcată cu ^{14}C condensează cu acidul oxalilacetic cu formare de acid citric;

— acetil~SCoA marcată cu ^{14}C, în cadrul ciclului acidului glioxilic reacționează cu acesta cu formare de acid *L*-malic. O dovadă în acest sens o constituie faptul că acidul *L*-malic marcat apare în mediu într-un interval de timp mult mai scurt decît cel necesar parcurgerii tuturor etapelor din cadrul ciclului Krebs. Ambele posibilități de incorporare a trasorului radioactiv sînt analoage ca mecanism deoarece gruparea metil a acetil~SCoA condensează cu gruparea carbonil a unui α-cetoacid, reacțiile fiind însă catalizate de două enzime distincte. Condensarea acetil~SCoA cu acidul glioxilic este catalizată de malat sintetaza, descoperită și extrasă inițial din celulele de *E. coli*. Glioxilatul necesar acestei reacții de condensare este furnizat de reacția catalizată de izocitrază, enzimă descoperită în 1953 în culturile de *Pseudomonas* și care catalizează scindarea izocitratului cu formare de acid succinic și acid glioxilic:



Acid izocitric *Acid succinic* *Acid glioxilic*

Kornberg și Madsen au arătat că acidul glioxilic care rezultă reacționează rapid cu acetil~SCoA cu formare de acid malic, reacție catalizată de malat sintetază:



Acid malic

Acidul malic astfel rezultat este oxidat cu formare de acid oxalilacetic și acesta la rîndul lui condensează cu o nouă moleculă de acetil~SCoA pentru a forma acid citric.

Reprezentarea schematică a ciclului acidului glioxilic (fig. 15.4) scoate clar în evidență faptul că *rezultatul global al transformărilor constă în sinteza unei molecule de acid succinic din două molecule de acid acetic*, iar

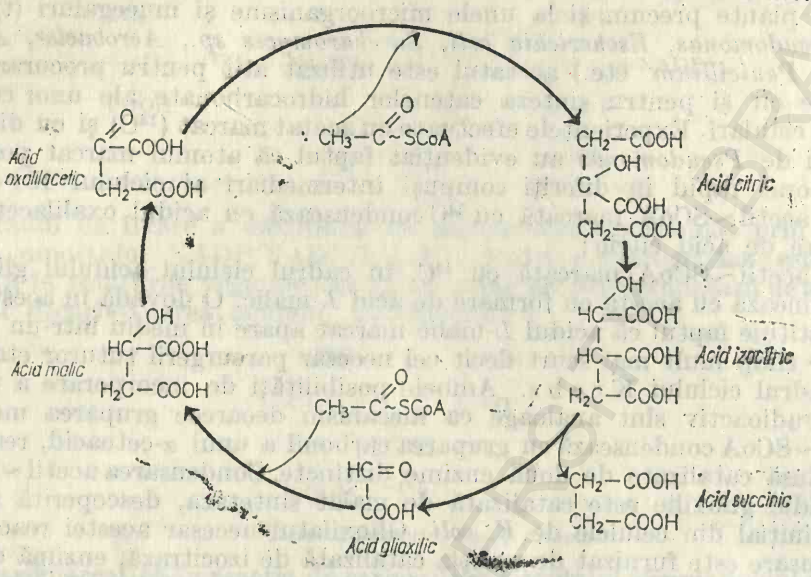


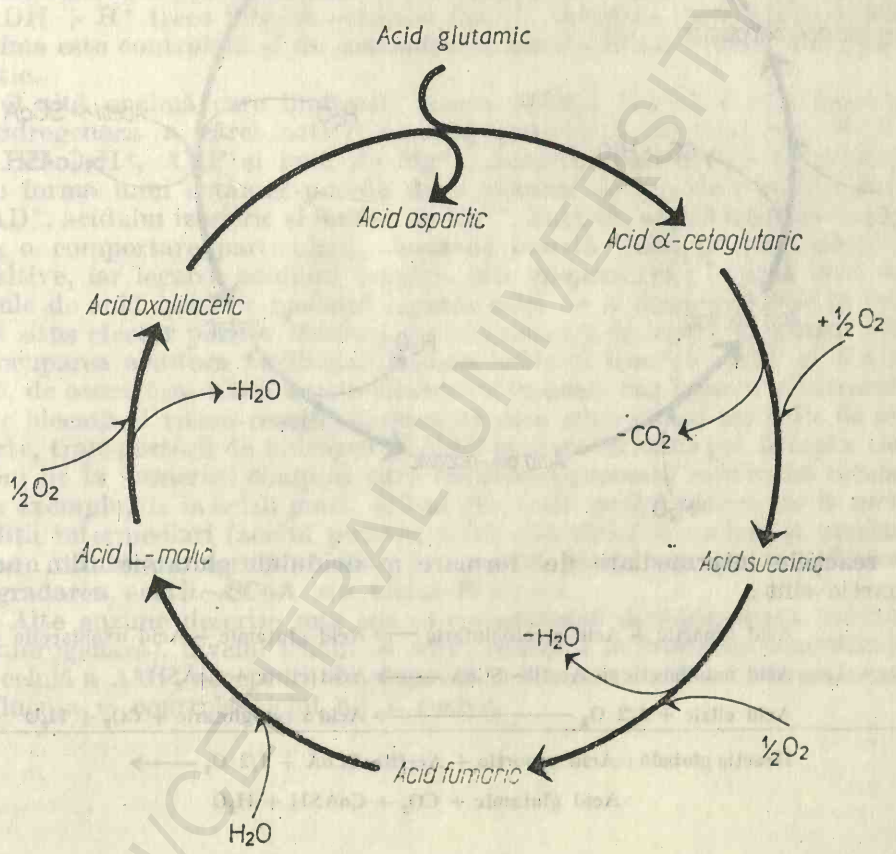
Fig. 15.4. — Ciclul acidului glioxilic.

o pereche de atomi de hidrogen trec de la acidul malic la oxigenul molecular prin intermediul catenei de respirație și astfel participă la procesul de fosforilare oxidativă a ADP.

Ciclul glioxilic este, de asemenea, important pentru plante și microorganisme deoarece el *permite sinteza unor acizi* C_4*-carboxilici din acid acetic*, în cazul cînd acesta constituie în celulă singura sursă de atomi de carbon. Acizii carboxilici cu patru atomi de carbon constituie pentru aceste organisme o sursă deosebit de importantă pentru sinteza numeroșilor constituenți celulari : glucide, pirimidine, aminoacizi, compuși cu doi atomi de carbon etc. Ciclul glioxilic este important, de asemenea, pentru *transformarea lipidelor în zaharuri via acidului succinic*, deoarece acizii dicarboxilici cu patru atomi de carbon care se formează din acetat în cadrul ciclului pot fi transformați în acid fosfopiruvic, iar acesta în hexoze. Transformarea acizilor grași, deci a lipidelor în zaharuri este întîlnită la semințele plantelor bogate în uleiuri, de exemplu, la *Ricinus communis*, *Cucurbita pepo*, *Helianthus annuns* și la *Arachis*, deoarece semințele acestor plante conțin echipamentul enzimatic necesar acestor transformări. Este important de subliniat faptul că dacă mitocondriile sînt sediul proceselor enzimatice specifice ciclului K r e b s chiar și la plantele superioare, enzimele care conferă particularitățile ciclului glioxilic sînt localizate în alte infrastructuri celulare *glioxizomii*, formațiuni care nu posedă sistemul citocromic. Glioxizomii sînt prezenți în celulele plantelor care pot transforma acizii grași în zaharuri.

15.5 CICLUL ACIZILOR GLUTAMIC-ASPARTIC ŞI ASPARTIC-GLUTAMIC

O cale modificată a ciclului Krebs a fost observată în cazul acidului glutamic: dacă acesta este adăugat la secţiuni de ţesuturi, omogenate sau particule celulare spălate el este transformat printr-o reacţie de oxidare în acid aspartic. *Acidul glutamic este oxidat via acizilor tricarboxilici cu formare de acid oxalilacetic*, care ulterior reacţionează cu o nouă moleculă de acid glutamic şi în cadrul unei reacţii de transaminare se formează acid α-cetoglutaric şi acid aspartic. În ficatul de porumbel, în creierul de şobolan şi în alte ţesuturi animale aproximativ 50—100% din azotul aminic al acidului glutamic poate fi regăsit în acidul aspartic. Schematic acest proces poate fi redat astfel:



iar reacţiile parţiale sînt următoarele:

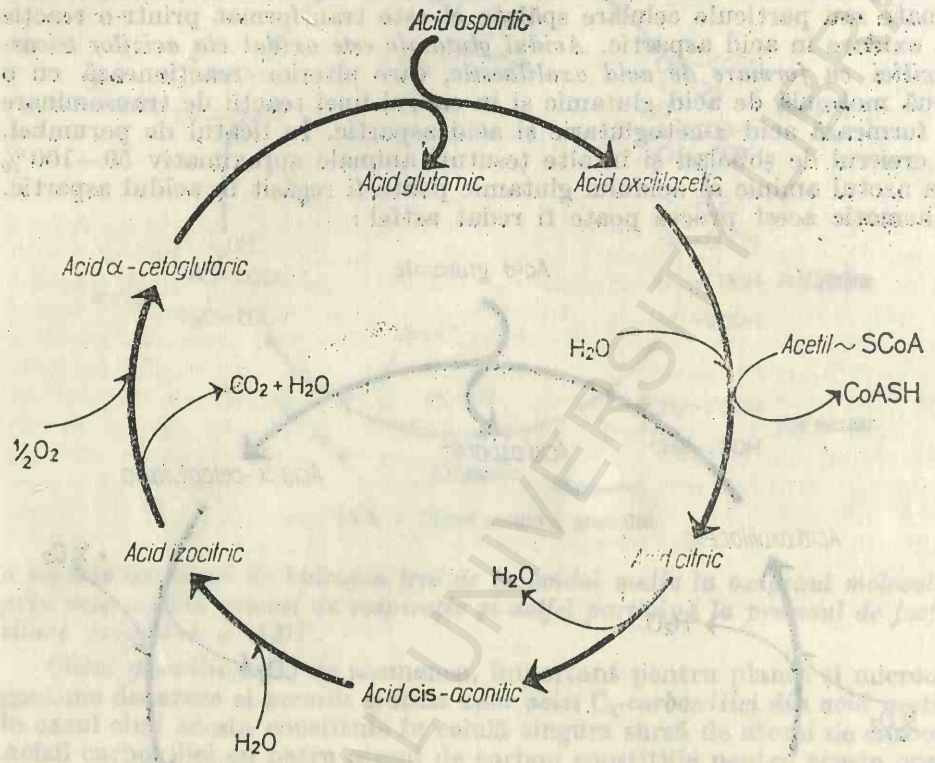
Acid glutamic + Acid oxalilacetic ⟶ Acid α-cetoglutaric + Acid aspartic

Acid α-cetoglutaric + 1/2 O_2 ⟶ Acid succinic + CO_2

Acid succinic + O_2 ⟶ Acid oxalilacetic + H_2O

Reacţia globală: Acid glutamic + 3/2 O_2 → Acid aspartic + CO_2 + H_2O

Printr-un mecanism asemănător acidul aspartic este oxidat cu acumulare de acid glutamic, tot în cadrul unei modificări a ciclului lui Krebs: acidul α-cetoglutaric care rezultă este folosit în cadrul unei reacții de transaminare cu acidul aspartic cu formare de acid glutamic. Schematic procesul poate fi redat sub forma următoare:



iar reacțiile intermediare de formare a acidului glutamic din acid aspartic sînt:

Acid aspartic + Acid α-cetoglutaric ⟶ Acid glutamic + Acid oxalilacetic

Acid oxalilacetic + Acetil~SCoA ⟶ Acid citric + CoASH

Acid citric + 1/2 O_2 ⟶ Acid α-cetoglutaric + CO_2 + H_2O

Reacția globală: Acid aspartic + Acetil~SCoA + 1/2 O_2 ⟶

Acid glutamic + CO_2 + CoASH + H_2O

15.6 CONTROLUL ȘI REGLAREA CICLULUI LUI KREBS

Respirația celulară este un proces complex din care cauză reglarea și controlul ei depinde de numeroși factori de natură diferită: *concentrația și activitatea enzimelor, a cofactorilor și a substratelor,* de *viteza cu care*

este consumat oxigenul, de viteza cu care cofactorii reduși sînt reoxidați prin cedarea electronilor în catena de respirație oxigenului molecular. În majoritatea cazurilor respirația celulară este cuplată obligatoriu cu procesele de fosforilare oxidativă a ADP. Pe de altă parte, cantitatea de ATP exercită un control direct asupra vitezei cu care este consumat oxigenul. Citrat sintetaza este una din enzimele care limitează viteza ciclului K r e b s și este inhibată atît de NADH + H^+ cît și de ATP. Acțiunea ATP este indirectă și reflectă faptul că ATP acumulat conduce la formarea de GTP din GDP, iar acumularea de GTP determină la rîndul ei o stocare a succinil~SCoA format sub influența α-cetoglutarat dehidrogenazei. Succinil~SCoA și NADH + H^+ se cuplează cu efectorul specific al citrat sintetazei ceea ce conduce la o creștere a K_M a acestei enzime pentru acetil~SCoA. Citrat sintetaza purificată din *E. coli* este un tetramer care după legarea NADH + H^+ trece într-un octamer inactiv catalitic. Activitatea acestei enzime este controlată și de concentrația acetil~SCoA și a acidului oxalilacetic.

O altă enzimă care limitează viteza ciclului K r e b s este izocitrat dehidrogenaza a cărei activitate este controlată de izocitrat, NAD^+, NADH + H^+, AMP și ionii de Mg^{2+}. Această enzimă care se prezintă sub forma unui octamer posedă două situsuri de reacție pentru legarea NAD^+, acidului izocitric și ionilor de Mg^{2+}. Față de acidul izocitric enzima are o comportare particulară, deoarece posedă două situsuri efectoare pozitive, iar legarea acidului izocitric este cooperativă : legarea unei molecule de acid izocitric mediază legarea celei de a doua molecule la celălalt situs efector pozitiv. Enzima posedă situsuri de legare și pentru AMP și ocuparea acestora facilitează legarea acidului izocitric. ATP și NADH pot, de asemenea, bloca aceste situsuri și în acest caz legarea substratului este blocată și viteza reacției enzimatice este minimă sau nulă. Pe de altă parte, transportorii de hidrogen (NAD^+) în stare oxidată pot accepta electroni de la numeroși compuși care rezultă în procesul respirației celulare (de exemplu, de la acizii grași, acidul glutamic, acidul lactic), de la metaboliții intermediari (acidul piruvic, acizii din ciclul K r e b s) și prezența lor în celulă sub formă oxidată sau redusă poate accelera sau diminua degradarea acetil~SCoA *via* ciclul K r e b s.

Alte enzime descrise mai sus (α-cetoglutarat dehidrogenaza, succinat dehidrogenaza), nivelul scăzut al ATP, reflectat în creșterea concentrației în celulă a AMP, acceptorii de electroni în stare oxidată pot, de asemenea, influența și controla ciclul lui K r e b s.

16

OXIDĂRI CELULARE. FOSFORILAREA OXIDATIVĂ ȘI ACUMULAREA DE ENERGIE

Oxidarea substanțelor organice în organisme are loc cu formare de dioxid de carbon, apă și energie, înmagazinată sub formă de legături în compușii macroergici (tabelul 16.1). Reacția globală a oxidării biologice a glucozei poate fi prezentată astfel :

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O - (+ 266 \text{ kcal})$$

Acest proces nu este o ardere simplă, o oxidare a substanței organice în prezența oxigenului atmosferic, ci reprezintă un proces complicat, în care inițial are loc degradarea glucozei la compuși intermediari cu cîte trei și doi atomi de carbon (aldehida glicerică, acid fosfoglicerinic, acid piruvic, acetat activ), ulterior catabolizarea continuîndu-se pînă la formarea produșilor finali ai proceselor de oxidare biologică. Dioxidul de carbon ia naștere în urma reacțiilor de decarboxilare a compușilor carboxilici. Din ciclul K r e b s rezultă șase H legați în structura a trei molecule de NADH + H^+ în urma dehidrogenării izocitratului (reacție catalizată de izocitrat dehidrogenază), a α-cetoglutaratului (reacție complexă catalizată de α-cetoglutarat dehidrogenază), și a malatului (re-

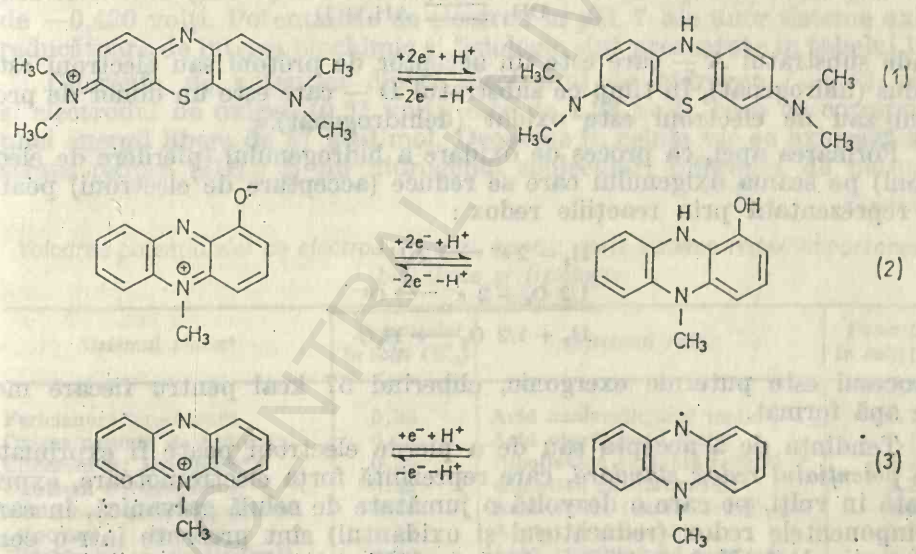
TABELUL 16.1

Compușii care prezintă legături macroergice și energia liberă standard după hidroliza lor, la pH 7

Denumirea compusului	$-G^{\circ\prime}$
Acetil adenilat	13 300
Acetil imidazol	13 300
Fosfoenolpiruvat	13 000
Acetoacetil ~ SCoA	10 500
Acetil fosfat	10 500
S-Adenozil metionina	10 000
Fosfocreatina	9 000
Esteri ai aminoacizilor	8 400
Acetil tioesterii	7 700
Mg ATP (AMP, PP)	7 600
Mg ATP (ADP, P_i)	7 400
Uridin difosfat glucoza	7 600
Fosfodiesterii	6 000
Aldozo-1-fosfații	5 000
Glutamina	3 400
Glicozizi	3 000
Fosfomonoesteri	3 000

acție catalizată de malat dehidrogenaza) și doi H în structura unei molecule de $FADH_2$, rezultat în urma dehidrogenării succinatului (sub acțiunea catalitică a enzimei succinat dehidrogenaza). Cei opt H preluați de NAD^+ și FAD sînt activați sub formă de protoni în cadrul catenei respiratorii cînd pot reacționa cu anionul O^{2-} activat de citocromul a_3 pentru a da naștere moleculei de apă. Energia care rezultă în urma acestui proces complex este datorată reacției de combinare a hidrogenului cu oxigenul transportat de hemoglobină de la plămîni la țesuturi. O parte din energia eliberată în urma acestor procese redox este înglobată sub formă de legături chimice în structura ATP.

Procesele redox. Studiul oxidării substanțelor de către omogenatele tisulare a fost elaborat prin prisma proceselor de oxido-reducere de W i l a n d și T h u n b e r g, care au observat că oxigenul poate fi substituit și cu alte substanțe acceptoare de hidrogen, de exemplu, cu albastru de metilen. Aceste experiențe au generat ipoteza formulată de acești autori, conform căreia *rolul esențial în oxidarea biologică îi revine hidrogenului și procesul rezidă, în principal, în activarea acestuia la nivelul substratului cu trecerea lui într-o formă capabilă să reacționeze fie cu oxigenul, fie cu* un *alt acceptor de hidrogen.* Coloranții folosiți în reacțiile de oxido-reducere în experimentele efectuate pe dehidrogenaze sînt *albastrul de metilen* (1), *piocianină* (2) și *fenazin metasulfatul* (3) care acceptă și cedează electroni conform reacțiilor:



Acestei ipoteze O. W a r b u r g, V. I. P a l l a d i n și alții îi contrapun teoria care presupune că oxidarea biologică constă de fapt în procesul de *activare a oxigenului* de către o enzimă care conține fier denumită *oxidază.* B a c h (1912) formulează teoria oxidării peroxidice conform căreia *hidrogenul substratului oxidat este transformat într-un peroxid.* Descoperirea de către K e i l i n (1925) a citocromilor a demonstrat că în oxidarea biologică are loc atît activarea hidrogenului cît și a oxige-

nului și odată cu izolarea numeroșilor transportori biologici de hidrogen cele două teorii nu mai apar antagonice.

În privința *hidrogenului activat* implicat în reacțiile de dehidrogenare și transport există și astăzi diferite ipoteze și formulări uneori imprecise, datorită în special faptului că nu se cunoaște natura chimică a hidrogenului activat, care poate să se găsească sub formă atomică, de radical sau de ion (proton sau ion hidrură) rezultat din $H^{\bullet} + H^{\bullet} \rightarrow H:^{-} + H^{+}$. Din această cauză în literatură se folosesc doi termeni diferiți, care de fapt vor să exprime același fenomen: *transfer de hidrogen* și *transfer de electroni*. În textul de față se va utiliza termenul transferul de electroni, pe care-l considerăm ca exprimînd mai exact unele fapte experimentale.

Reacțiile de oxido-reducere sînt acele reacții care au loc cu transfer de electroni de la o *substanță donoare (agent reducător)* la una *acceptoare de electroni (agent oxidant)*, conform ecuației:

$$\text{Reducător} \rightleftharpoons \text{Oxidant} + ne^{-}$$

Reacțiile de hidrogenare și de dehidrogenare sînt cazuri particulare de reacții redox în care un substrat este redus de hidrogenul molecular sau de substanțe donoare de hidrogen și respectiv oxidat prin îndepărtarea atomilor de hidrogen din substrat, de exemplu,

$$A + H_2 \rightleftharpoons AH_2$$

$$A + DH_2 \rightleftharpoons AH_2 + D$$

unde substratul A — care este un acceptor de protoni sau electroni este redus (hidrogenat), în timp ce substratul D — care este un donor de protoni sau de electroni este oxidat (dehidrogenat).

Formarea apei, ca proces de oxidare a hidrogenului (pierdere de electroni) pe seama oxigenului care se reduce (acceptare de electroni) poate fi reprezentată prin reacțiile redox:

$$H_2 - 2e^{-} \longrightarrow 2H^{+}$$

$$\frac{1/2\ O_2 + 2e^{-} \longrightarrow O^{2-}}{}$$

$$H_2 + 1/2\ O_2 \longrightarrow H_2O$$

Procesul este puternic exergonic, eliberînd 57 kcal pentru fiecare mol de apă format.

Tendința de a accepta sau de a pierde electroni poate fi exprimată de *potențialul redox standard*, care reprezintă forța electromotoare, exprimată în volți, pe care o dezvoltă o jumătate de celulă galvanică, în care componentele redox (reducătorul și oxidantul) sînt prezente într-o concentrație de 1 *M*, la o temperatură de 25°C și la *p*H 7 — în echilibru cu un electrod care poate accepta electroni de la donorul de electroni.

Pentru a putea compara două sisteme redox s-a introdus noțiunea de *potențial redox* care reprezintă diferența de potențial față de electrodul de hidrogen, ales în mod arbitrar ca electrod de referință (fig. 16.1). Potențialul reacției redox:

$$H_2 \rightleftharpoons 2H^{+} + 2e^{-}$$

este considerat în mod convenţional egal cu 0,0 volţi, în condiţiile în care presiunea hidrogenului gazos este de 1 atm şi concentraţia lui de 1 *M* (*p*H 0).

Pentru a obţine potenţiale standard, ar trebui ca măsurătorile să fie efectuate la o concentraţie în ioni de hidrogen egală cu unitatea deci la *p*H 0. Deoarece această situaţie nu este compatibilă cu parametrii optimi

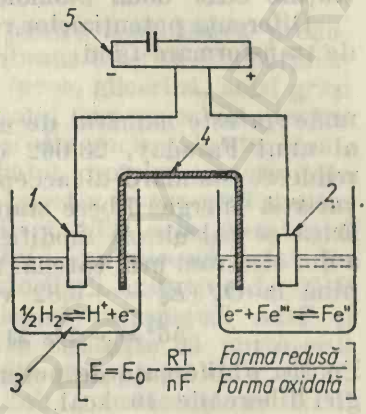


Fig. 16.1. — Dispozitiv pentru măsurarea potenţialului redox:

1. — electrodul de hidrogen; 2. — electrodul acceptor de electroni; 3 — celula galvanică standard în care are loc procesul redox; 4 — punte de legătură între elementele celulei galvanice agar-KCl; 5 — instrument de măsură a variaţiei curentului, exprimată în volţi (E'_0).

metabolismului celular, în biochimie se folosesc potenţiale raportate la *p*H fiziologic (*p*H 7) cînd electrodul de hidrogen prezintă un potenţial de —0,420 volţi. Potenţialele de electrod la *p*H 7 ale unor sisteme oxido-reducătoare de interes biochimic şi fiziologic sînt prezentate în tabelul 16.2.

Diferenţa de potenţial dintre electrodul de hidrogen (—0,42 volţi) şi electrodul de oxigen (0,81 volţi) este de 1,23 volţi, ceea ce corespunde unei energii libere de 57 kcal/mol. Deoarece în celula vie se oxidează substrate reduse (DH_2) şi nu hidrogenul molecular, diferenţa de potenţial

TABELUL 16.2

Valoarea potenţialelor de electrod, în volţi, pentru unele sisteme redox importante în biochimie şi fiziologie

*Sistemul redox**	*Potenţialul în volţi* (E'_0)	*Sistemul redox*	*Potenţialul în volţi* (E'_0)
Fericianură/ferocianură	0,36	Acid oxalacetic/acid malic	—0,17
Oxigen/peroxid de hidrogen	0,30	Acid piruvic/acid lactic	—0,19
Citocrom *a*: feric/feros**	0,29	Riboflavină (oxidată/redusă)	—0,21
Citocrom *c*: feric/feros	0,22	Glutation (oxidat/redus)	—0,23
Methemoglobină/hemoglobină	0,17	Acid lipoic (oxidat/redus)	—0,29
Citocrom b_2: feric/feros	0,12	Acetat/acetaldehidă	—0,60
Ubichinonă (oxidată/redusă)	0,10	Acid succinic/acid α-cetoglutaric	—0,67
Albastru de metilen (oxidat/redus	0,01	Acid acetic + CO_2/acid piruvic	—0,70

* Sistemele redox sînt date în ordinea descrescîndă a valorilor potenţialului de electrod, exprimate în volţi.

** Se are în vedere forma oxidată Fe^{3+} şi forma redusă Fe^{2+} a citocromilor

reală față de hidrogen este de 1,13 volți, ceea ce corespunde unei energii libere mai mici, de numai 52 kcal/mol. Această energie nu este eliberată spontan, în totalitate, ci în etape, sub forma unor cuante, energia liberă a sistemului scăzînd treptat.

În sistemele biologice, potențialul redox nu poate fi măsurat direct, însă poate fi calculat din valoarea potențialului standard și din concentrațiile celor două biomolecule componente.

Diferența potențialelor redox este o măsură a energiei libere $G°$, relația de transformare fiind

$$\Delta G° = -n \cdot F \cdot \Delta E_0,$$

unde: n este numărul de electroni transferați; F — echivalentul caloric al unui Faraday, 23 062 cal; ΔE_0 — diferența dintre potențialele de reducere standard al acceptorului și al donorului de electroni; $\Delta G°$ — variația energiei libere standard, exprimată în calorii.

Dacă se calculează modificarea de energie liberă necesară transferului a doi electroni prin catena respiratorie, de la NADH ($E_0^1 = -0{,}32$ volți) pînă la O_2 ($E_0^1 = +0{,}82$ volți) se obține valoarea:

$$\Delta G° = -2 \times 23\,062 \times 0{,}82 - (-0{,}32) = -52{,}7 \text{ kcal.}$$

Pentru o diferență de potențial de 1 volt corespunde o variație a energiei libere de 46 kcal.

Catena respiratorie. Procesele de respirație celulară și de fosforilare oxidativă au loc în aproape toate celulele aerobe. La eucariote, enzimele implicate sînt localizate în mitocondrii, iar la procariote în membrana celulară.

Mitocondriile, sediul oxidării glucidelor, lipidelor, aminoacizilor — în cadrul catenei respiratorii, al ciclului Krebs *și al degradării oxidative a acizilor grași* — sînt particule intracelulare de o formă globulară cu un diametru de aproximativ 1 μ ce ocupă aproximativ 20 % din volumul citoplasmei. Electronomicroscopic, mitocondriile prezintă două membrane: una internă și alta externă care diferă prin compoziția în lipide și prin echipamentul enzimatic. Membrana internă formează niște invaginări sau pliuri numite *criste mitocondriale* (fig. 16.2) pe care se află particulele Fernandez-Moran cu rol în procesele redox. Membrana internă a unei mitocondrii prezintă o suprafață de contact deosebit de mare, de exemplu, cea dintr-un hepatocit prezintă o suprafață de 40 m² per gram proteină, iar cea dintr-o celulă a miocardului — 250 m². Aproximativ 20—25 % din concentrația totală în proteine a membranei interne o constituie enzimele catenei respiratorii și cele implicate în procesele de fosforilare oxidativă și deci în sinteza ATP. Membrana externă prezintă mici vezicule, care par a purta enzimele ciclului Krebs. Matricea, ce reprezintă

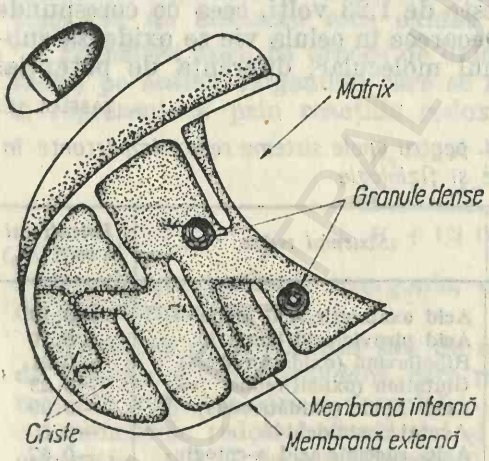


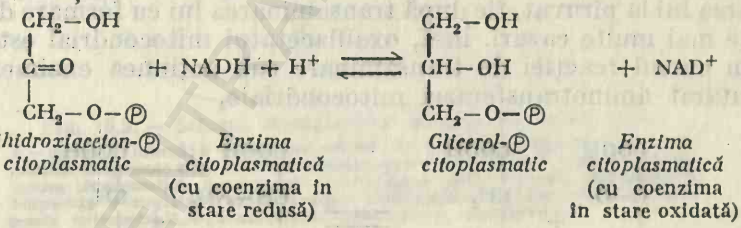
Fig. 16.2. — Structura unei mitocondrii.

spațiul intern al mitocondriei situat între criste este, de asemenea, bogată în enzime și în DNA. Mitocondriile cu criste numeroase, ca cele prezente în celulele musculare, sînt adaptate pentru procesul respirator, în timp ce acelea cu un spațiu matriceal mare, posedînd în schimb puține criste, de exemplu, mitocondriile celulelor hepatice, sînt adaptate funcțional pentru realizarea altor procese metabolice.

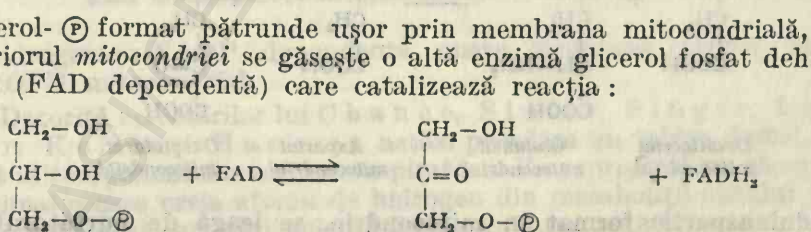
Deși membrana externă este permeabilă pentru majoritatea produșilor metabolici cu masă moleculară mică, membrana internă este permeabilă numai pentru apă, molecule neutre mici (uree, glicerină, acizi grași cu un număr redus de atomi de carbon) și total impermeabilă pentru NAD^+, $NADP^+$, NADH, NADPH, ATP, CoA și alte nucleotide etc. Membrana internă conține o serie de *purtători* (probabil, proteine cu activitate permeazică) care efectuează în mod specific și selectiv transportul acestor compuși prin structura ei. Transportul ADP și ATP prin membrana internă a fost studiat cu ajutorul *atractilozidului* — un glicozid izolat din planta *Atractylis gummifera* — inhibitor al fosforilării oxidative de ADP extramitocondrial, deoarece de fapt el împiedică transportul ADP și ATP prin membrana mitocondrială. Astăzi se cunoaște că purtătorul ADP și ATP este extrem de specific (nu permite transportul GTP, CTP, GDP și CDP) și realizează o difuzie de schimb: o moleculă de ADP intră în mitocondrie și o moleculă de ATP părăsește această infrastructură. Există asemenea sisteme purtător și pentru metaboliții: succinat-malat, citrat-*cis*-aconitat-izocitrat etc.

Mitocondriile sintetizează continuu NADH prin dehidrogenarea diferiților produși ai metabolismului intermediar, dar NADH intramitocondrial nu poate părăsi mitocondria pentru a trece în citoplasmă. Cu toate acestea, electronii NADH intramitocondrial pot trece în citoplasmă prin mecanismele tip „suveică" care utilizează fie *cuplul glicerol-fosfat-dihidroxiacetonfosfat*, fie *cuplul malat-oxaloacetat*.

În citoplasmă, enzima glicerolfosfat dehidrogenaza (NAD-dependentă) catalizează reacția:

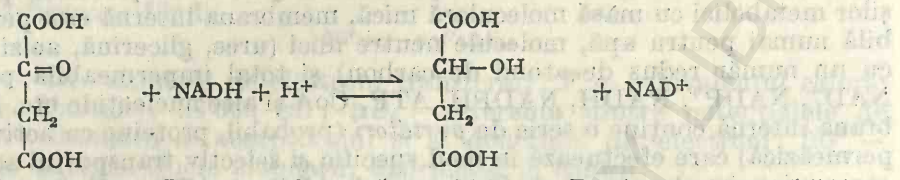


Glicerol-Ⓟ format pătrunde ușor prin membrana mitocondrială, iar în interiorul *mitocondriei* se găsește o altă enzimă glicerol fosfat dehidrogenaza (FAD dependentă) care catalizează reacția:



Enzima mitocondrială cu gruparea flavinică redusă, din interiorul mitocondriei, intră în catena respiratorie cedînd protonii direct sistemului redox ubichinonă-ubihidrochinonă. Al doilea mecanism tip „suveică" este realizat printr-o suită de reacţii similare.

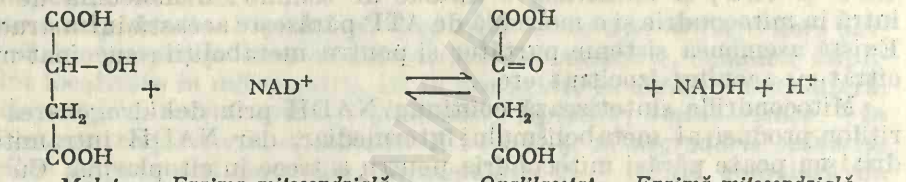
În citoplasmă enzima malat dehidrogenaza catalizează reacţia de reducere a oxalilacetatului cu formare de malat:



Oxalilacetat citoplasmatic — *Enzima citoplasmatică* (cu coenzima în stare redusă) — *Malat citoplasmatic* — *Enzima citoplasmatică* (cu coenzima în stare oxidată)

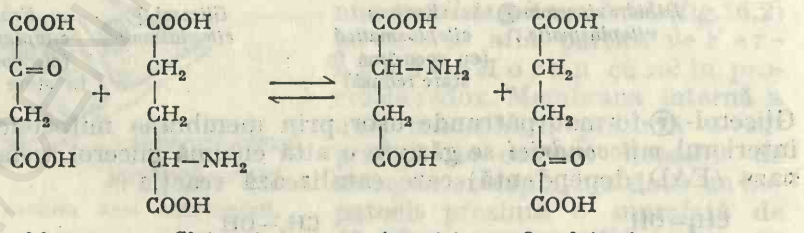
Malatul citoplasmatic poate pătrunde uşor prin membrana mitocondrială deoarece în aceasta se găseşte un purtător specific.

În mitocondrie, o altă enzimă malat dehidrogenază catalizează reacţia:



Malat mitocondrial — *Enzima mitocondrială* (cu coenzima în stare oxidată) — *Oxalilacetat mitocondrial* — *Enzimă mitocondrială* (cu coenzima în stare redusă)

Oxalilacetatul format în mitocondrie poate părăsi infrastructura trecînd prin membrana acesteia în citoplasmă fie direct, fie după decarboxilarea lui la piruvat, fie după transaminarea lui cu formare de aspartat. În cele mai multe cazuri, însă, oxalilacetatul mitocondrial este transformat în cursul reacţiei de transaminare sub acţiunea enzimei aspartat-oxoglutarat aminotransferazei mitocondriale,



Oxalilacetat mitocondrial — *Glutamat mitocondrial* — *Aspartat mitocondrial* — *Oxoglutarat mitocondrial*

Acidul aspartic format în mitocondrie, se leagă de purtătorul lui specific, pătrunde prin membrana mitocondrială şi trece în citoplasmă, unde sub acţiunea enzimei aspartat-oxoglutarat aminotransferazei citoplasmatice este retransformat în oxaloacetat care reintră în mecanismul

„suveică". În figura 16.3 sînt prezentate schematic cele două mecanisme de schimb a echivalenţilor reducători între mitocondrie şi citoplasmă.

În mod similar, NADPH mitocondrial poate fi utilizat pentru sinteza NADPH citoplasmatic, şi invers, NADP citoplasmatic cu ajutorul mecanismului suveică izocitrat-oxalilsuccinat şi sub acţiunea enzimei izocitrat-

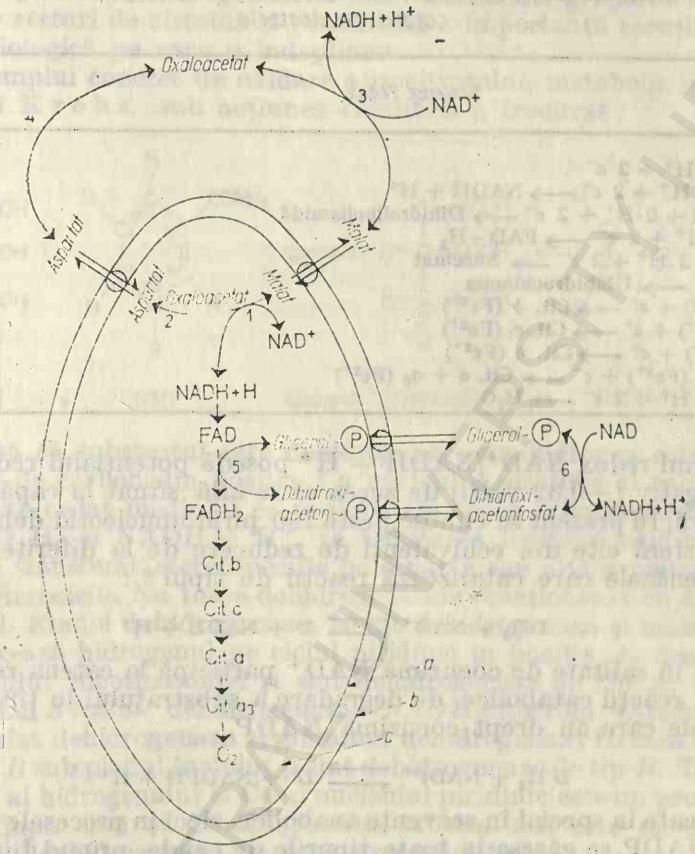


Fig. 16.3. — Schema mecanismelor suveică din mitocondrie:
a — membrană internă; *b* — membrană externă; *c* — matrix. Enzimele care catalizează reacţiile componente sînt: 1 — malat dehidrogenaza mitocondrială, 2 — malat dehidrogenaza citoplasmatică, 3 — aspartat: 2-cetoglutarat aminotransferaza mitocondrială, 4-aspartat: 2-cetoglutarat aminotransferaza citoplasmatică, 5-glicerol-3-fosfat dehidrogenaza mitocondrială, 6-glicerol-3-fosfat dehidrogenază citoplasmatică.

dehidrogenaza-NADP dependentă poate fi folosit pentru biosinteza NADPH mitocondrial.

Datorită cercetărilor lui Chance, Slater, Singer, Lehninger, Keilin şi Hartree astăzi posedăm un tablou destul de complet al componentelor catenei respiratorii. Ea reprezintă un sistem multienzimatic care preia atomii de hidrogen din metaboliţii ciclului Krebs şi ai procesului β-oxidării acizilor graşi prin intermediul coenzimelor NAD^+ şi FAD, pe care-i transportă şi-i oxidează în final, cu formarea apei. În catena respiratorie, succesiunea enzimelor este realizată în funcţie de

potențialele redox ale coenzimelor (tabelul 16.3). Electronii „se scurg" de la substratele relativ electronegative, în ordinea crescătoare a potențialelor redox spre oxigenul tisular sau celular, furnizat de hemoglobină.

TABELUL 16.3

Potențialele redox standard, la pH 7 și 30°C, exprimate în volți, pentru participanții la catena respiratorie

Sisteme redox	*Potențiale redox*
$H_2 \longrightarrow 2\ H^+ + 2\ e^-$	−0,42
$NAD^+ + 2\ H^+ + 2\ e^- \longrightarrow NADH + H^+$	−0,32
Lipoilamidă + 2 H^+ + 2 e^- ⟶ Dihidrolipoilamidă	−0,29
$FAD + 2\ H^+ + 2\ e^- \longrightarrow FAD{-}H_2$	−0,06
Fumarat + 2 H^+ + 2 e^- ⟶ Succinat	+0,031
Ubichinona ⟶ Ubihidrochinona	+0,100
Cit. *b* (Fe^{3+}) + e^- ⟶ Cit. *b* (Fe^{2+})	+0,050
Cit. c_1 (Fe^{3+}) + e^- ⟶ Cit. c_1 (Fe^{2+})	+0,220
Cit. *c* (Fe^{3+}) + e^- ⟶ Cit. *c* (Fe^{2+})	+0,254
Cit. $a + a_3$ (Fe^{3+}) + e^- ⟶ Cit. $a + a_3$ (Fe^{2+})	+0,28
1/2 O_2 + 2 H^+ + 2 e^- ⟶ H_2O	+0,815

Sistemul redox $NAD^+/NADH + H^+$ posedă potențialul redox cel mai electronegativ (−0,32 volți) de aceea el se află situat la capătul catenei respiratorii. În prezent se cunosc peste 150 piridinnucleotid dehidrogenaze care transferă cîte doi echivalenți de reducere de la diferite substrate. Dehidrogenazele care catalizează reacții de tipul * :

$$DH_2 + NAD^+ \rightleftharpoons D + NADH + H^+$$

și care au în calitate de coenzimă NAD^+ participă la catena respiratorie, catalizînd reacții catabolice, de degradare a substratului în timp ce dehidrogenazele care au drept coenzimă NADP,

$$D'H_2 + NADP^+ \rightleftharpoons D' + NADPH + H^+$$

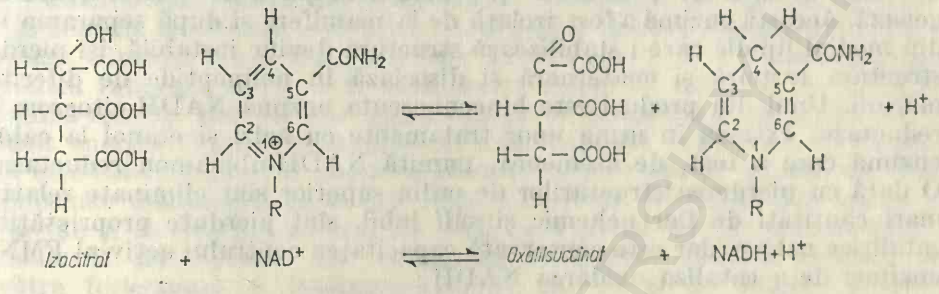
sînt implicate în special în secvențe anabolice, deci în procesele de sinteză. NAD și NADP se găsesc în toate tipurile de celule, primul fiind prezent în cantități mult mai mari. În hepatocite, 60% din cantitatea totală de NAD este identificată în mitocondrii, restul de 40% fiind prezent în citoplasmă. În cazul coenzimei fosforilate, (NADP), în citoplasmă se găsește o cantitate mai mare decît în fracția celulară particulată. Interesant este faptul că numai NADH mitocondrial participă la catena respiratorie, NAD redus prezent în citoplasmă nu poate străbate membrana mitocondriei și deci nu poate participa nici la transferul electronilor în catena respiratorie.

Cu excepția glutamat dehidrogenazei care reacționează la fel de bine cînd conține în calitate de coenzimă NAD^+ sau $NADP^+$, celelalte dehidrogenaze sînt înalt specifice pentru o formă sau alta a piridindinucleotidului. NAD în structura acestor dehidrogenaze este legat labil și poate

* Se notează cu DH_2 donorul de hidrogen care participă la reacțiile de oxido-reducere

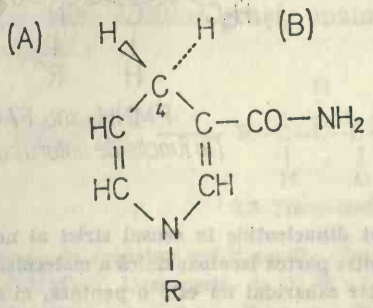
fi cedat ușor în cadrul reacțiilor redox. Excepție de la această regulă face gliceraldehid-3-fosfatdehidrogenaza, în care NAD^+ este legat covalent de apoenzimă. Multe piridin dehidrogenaze sînt metaloenzime în care ionul metalic are rolul de a lega coenzima, de a stabiliza o structură cuaternară sau/și este participant efectiv la actul catalitic. De asemenea, majoritatea NAD dehidrogenazelor sînt tiolenzime, grupările SH aparținînd unor resturi de cisteină și prezentînd o importanță esențială pentru funcția biologică pe care o îndeplinesc.

În exemplul concret de oxidare a izocitratului, metabolit intermediar al ciclului K r e b s, sub acțiunea catalitică a izocitrat :

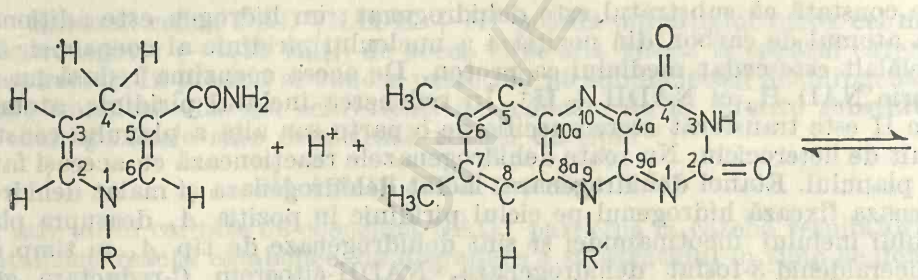


se constată că substratul este dehidrogenat; un hidrogen este adiționat la atomul de carbon din poziția 4 a nucleului piridinic al coenzimei, iar celălalt este cedat mediului ca proton. De aceea coenzima redusă nu se scrie $NAD.H_2$ ci $NADH + H^+$. În reducerea inelului piridinic, atomul de H este transferat stereospecific pe o parte sau alta a planului constituit de heterociclu. Nu toate dehidrogenazele reacționează cu aceeași față a planului. Etanol dehidrogenaza, lactat dehidrogenaza și malat dehidrogenaza fixează hidrogenul pe ciclul piridinic în poziția *A*, deasupra planului inelului nicotinamidei și sînt dehidrogenaze de tip *A*, în timp ce gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza, NADH-citocrom *C*-reductaza, glicerol-3-fosfat dehidrogenaza și glutamat dehidrogenaza fixează hidrogenul în poziția *B* sub planul inelului și sînt dehidrogenaze de tip *B*. Transportul enzimatic al hidrogenului la C4 al nucleului piridinic este un proces stereospecific, după cum și dehidrogenarea substratului este stereospecifică. Dihidrolipoildehidrogenaza nu este stereospecifică.

Coenzimele piridinnucleotidice pot fi considerate drept transportori mobili de electroni, deoarece pot disocia ușor de apoenzimă și pot constitui coenzima unui mare număr de enzime.

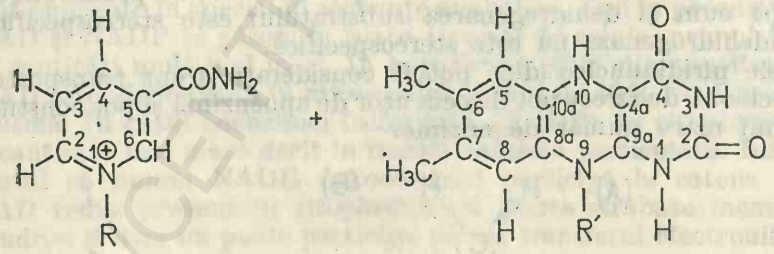


Nicotinamid dinucleotidul redus poate ceda hidrogenul *flavinenzimelor* care au în calitate de grupare prostetică *flavinmononucleotidul* (FMN) *. În structura flavinenzimelor, FMN sau FAD sînt grupări prostetice legate puternic de apoenzimă, incapabile de-a părăsi structura în timpul actului catalitic (excepţie face D-aminoacidoxidaza). Cea mai mare parte a FAD este localizat în mitocondrii (peste 60 %). Există cel puţin patru tipuri de flavinenzime (FE-1, FE-2, FE-3 şi FE-4) implicate în catena respiratorie. Flavinenzima-1, care face legătura între NADH şi sistemul citocromic, are o structură complexă, cu o masă moleculară ce variază între 100 000 şi 250 000 daltoni, conţine un mol de FMN, 16 atomi de fer nehemic, 27 moli de „sulf labil" şi poartă denumirea de NADH dehidrogenază. Această enzimă a fost izolată de la mamifere şi după separarea ei din mediul lipidic care-i stabilizează structura devine instabilă, îşi pierde structura terţiară şi cuaternară şi disociază în polipeptide de diferite mărimi. Unul din produşi este binecunoscuta enzimă NADH-citocrom *c* reductaza, extrasă în urma unor tratamente cu acizi şi etanol la cald, enzimă care a fost, de asemenea, numită NADH-ubichinon reductaza. O dată cu pierderea structurilor de ordin superior sînt eliminate relativ mari cantităţi de fier nehemic şi sulf labil, sînt pierdute proprietăţile catalitice native, dar este conservată capacitatea centrului activ al FMN-enzimei de a cataliza oxidarea NADH :



NADH+H$^+$ FMN *sau* FAD

(în funcţie de natura radicalului R')



NAD$^+$ FMNH$_2$ *sau* FADH$_2$

(în funcţie de natura radicalului R')

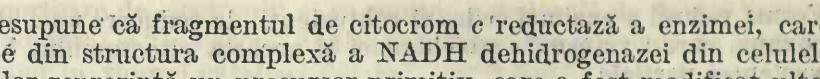
---

* FMN şi FAD nu sînt dinucleotide în sensul strict al noţiunii de nucleotid, deoarece legătura covalentă dintre partea izoaloxazinică a moleculei lor şi monozaharid nu este o legătură glicozidică, iar zaharidul nu este o pentoză, ci alcoolul corespunzător ribozei

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Se presupune că fragmentul de citocrom c reductază a enzimei, care face parte din structura complexă a NADH dehidrogenazei din celulele mamiferelor reprezintă un precursor primitiv, care a fost modificat ulterior în cursul evoluției.

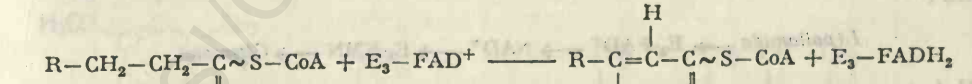
Un alt tip de flavinenzimă (FE-2) este succinat dehidrogenaza, care catalizează oxidarea reversibilă a acidului succinic la fumaric :



Enzima face parte din echipamentul enzimatic al ciclului Krebs din celulele aerobe ale vertebratelor, drojdiilor aerobe sau plantelor superioare. Enzima are o mare afinitate pentru succinat și o mică afinitate pentru fumarat, astfel încît acumularea ultimului substrat în celulă nu inhibă reacția. Enzima este legată funcțional de catena respiratorie, astfel încît energia chimică a oxidării nu este degajată sub formă de căldură ci este conservată prin cuplarea reacției cu procesul de sinteză de ATP. Succinat dehidrogenaza a fost izolată în stare cristalină din inima de bovine și ea conține un mol de FAD și 4 atomi de fier neheminic per moleculă de enzimă. Ea catalizează reducerea acidului succinic de către fericianură și fenazinmetasulfat, dar nu și de oxigen, albastru de metilen, citocrom *c*. Această enzimă a fost izolată și din plante și s-a dovedit că are o structură apropiată de cea a enzimei separate din țesuturile animale. Succinat dehidrogenaza de la toate celulele aerobe examinate, cînd vine în contact cu substratul, suferă o transformare conformațională, rapidă și reversibilă însoțită de trecerea ei de la o formă cu slabă activitate catalitică la alta extrem de reactivă catalitic. Acest fenomen, numit „activare" are, probabil, un rol de reglare în oxidările mitocondriale. Prin intermediul atomilor de fier nehemici și a lipidelor asociate, succinat dehidrogenaza realizează un contact funcțional deosebit de eficient cu ubichinona și prin mijlocirea acesteia cu sistemul citocromic. Ea nu este autooxidabilă nici în cazul unor presiuni mari de oxigen. Succinat dehidrogenaza izolată și purificată din celulele mamiferelor este o proteină cu o masă moleculară de aproximativ 175 000 cu un mol de FAD și opt atomi de fier neheminic în structură. Este ferm legată de membrana mitocondrială și face legătura cu celelalte componente ale catenei respiratorii prin intermediul ubichinonei, conform secvenței parțiale :

Succinat ⟶ *Succinat dehidrogenază* ⟶ *Ubichinonă*

Acil CoA dehidrogenazele acizilor grași, enzime din categoria FE-3 catalizează reacții de tipul :



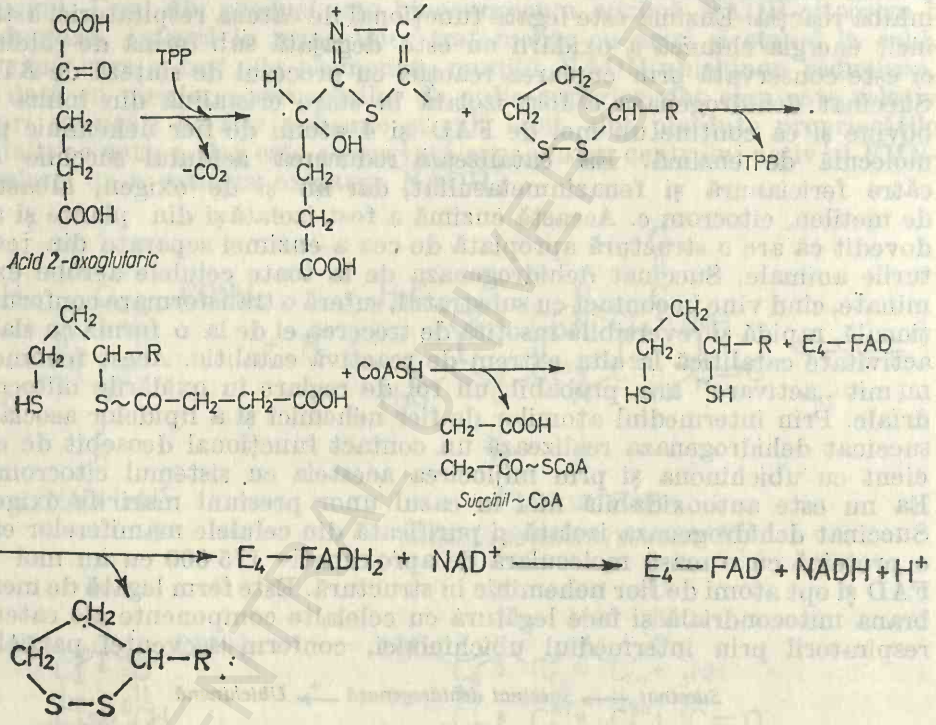
Acil~SCoA — 2,3-*Trans*-enoil~SCoA

ribitolul. Această categorie de coenzime pot fi numite dinucleotide numai prin analogie structurală cu NAD^+ și $NADP^+$. Descoperite de O. Warburg și Cristian, flavin enzimele au fost studiate ulterior de Kuhn, Karrer, Theorell și alții.

Forma redusă a enzimei cedează echivalenții de reducere unei alte flavin-enzime, care-i transmite ubichinonei și aceasta citocromului *b*, conform secvenței parțiale:

$$Acil\sim S\text{-}CoA \xrightarrow[dehidrogenaza]{} Acil\sim SCoA \longrightarrow Flavinenzimă \longrightarrow Ubichinonă \longrightarrow Cit.b$$

Cea de a patra flavin-enzimă (FE-4) participantă direct la catena respiratorie este: NADH: lipoilamidă oxidoreductaza (denumire veche diaforaza), enzimă cu o masă moleculară de aproximativ 100 000 ce are în structură doi moli de FAD^+, puternic legați. Enzima catalizează transferul hidrogenului de la dihidrolipoilamidă la NAD^+, din secvența metabolică:



De fapt, legătura cu catena respiratorie se realizează prin secvența parțială:

$$Lipoilamida \longrightarrow E_4\text{-}FAD^+ \longrightarrow NAD^+ \longrightarrow E_1\text{-}FMN \longrightarrow Citocromi$$

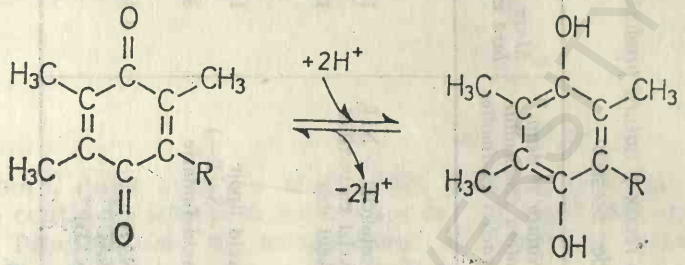
FE-4 are un potențial redox de —0,34 volți și prezintă o activitate de hidrogenare a NAD^+, în timp ce FE-1 are un potențial redox de —0,06 volți și realizează o dehidrogenare a NADH.

O altă flavin enzimă studiată și cu o structură mai particulară este *NADH citocrom-c-reductaza*, izolată din cordul de bovine din „particu-

lele transportoare de electroni" și ca conține o moleculă de flavină (structură necunoscută) și 2—4 atomi de fier neheminic per moleculă de enzimă, fierul trecînd în timpul catalizei din $Fe^{3+} \rightleftharpoons Fe^{2+}$. Plantele conțin și ele NADH citocrom *c*-reductază în mitocondrii.

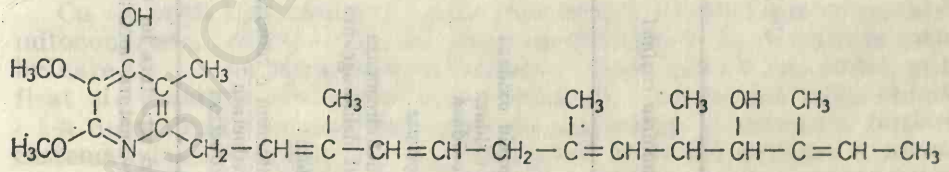
Alte flavinenzime care catalizează importante secvențe metabolice sînt *D*-aminoacid oxidaza, glucozo oxidaza, xantin oxidaza, glicerol 3-fosfat dehidrogenaza mitocondrială etc. Cîteva exemple de FAD-proteine care catalizează reacții de tip redox sînt redate în tabelul 16.4.

Compusul denumit *coenzima Q* sau *ubichinona* leagă toate flavinenzimele ce realizează intrări separate în catena respiratorie cu sistemul citocromic. Sistemul redox ubichinonă-ubihidrochinonă,



unde $R = -(CH_2-CH=C(CH_3)-CH_2-)_n H$

funcționează ca un colector de hidrogen. Cînd coenzima este reoxidată, hidrogenii nu sînt trecuți mai departe pe o altă componentă a catenei respiratorii ci sînt ionizați; protonii sînt transportați prin matricea mitocondrială pînă la capătul terminus al catenei, iar electronii sînt transportați prin sistemul citocromic pînă la citocromul a_3, autooxidabil și capabil de-a reduce oxigenul. Coenzima izolată din celulele mamiferelor prezintă zece unități (Q_{10}) izoprenoidice în structura radicalului R, în timp ce compusul izolat din bacterii și plante prezintă șase și opt unități izoprenoidice (Q_6, Q_8). Rolul posibil al coenzimei *Q* în catena respiratorie a putut fi stabilit, după multe controverse, cu ajutorul antibioticului piericidina, un analog structural al ubihidrochinonei:



compus care inhibă puternic transportul echivalenților de reducere între NADH dehidrogenază și citocromul *b*.

TABELUL 16.4

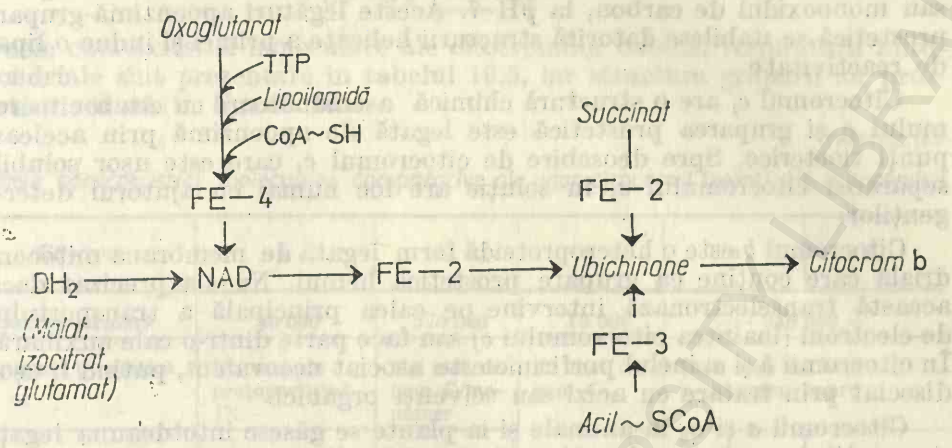
Unele flavoproteine care catalizează reacții de tip redox și natura produșilor reacțiilor enzimatice catalizate de acestea

Denumirea enzimei	*Denumirea donorului de electroni*	*Denumirea acceptorului de electroni*	*Natura și denumirea produsului reacției enzimatice*	*Masa moleculară a enzimei*	*Gruparea prostetică*	*Metalul prezent în structura enzimei***
I. Oxidaze:						
D-Aminoacid oxidaza	*D*-aminoacizii	Oxigenul	-cetoacizi + NH_3	100 000	FAD	
Aldehid oxidaza	Aldehidele	Oxigenul	Acizi carboxilici		FAD	Mo
Xantin oxidaza	Xantina	Oxigenul	Acid uric	190 000	FAD	Fe și Mo
II. Dehidrogenaze:						
Lipoil dehidrogenaza	Acidul lipoic (SH)	NAD^+	Acid lipoic (—S—S—)	100 000	2 FAD	
Succinat dehidrogenaza	Acidul succinic	Diferiți coloranți oxidați *	Acid fumaric	300 000	FAD	8 Fe^{2+}
III. Reductaze:						
NAD^+-citocrom *c* reductaza	$NADH + H^+$	Citocrom *c*	NAD^+	1 100 000		
Nitrat reductaza	$NADPH + H^+$	Nitratul	$NADP^+$		FAD	Me
Nitrit reductaza	$NADPH + H^+$	Nitritul	$NADP^+$		FAD	Me

* Vezi structura lor chimică și mecanismul de acțiune la pagina 649.
** Me— natura metalului nu este precizată

BCU IAȘI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Diferiți autori presupun participarea la acest nivel și a *chinonelor* vitaminelor *E* și *K* — la animale și a *plastochinonelor* la plante. Prin urmare, pînă la acest nivel catena respiratorie poate fi redată schematic astfel:



Citocromii, după cum s-a mai arătat în capitolul 4 sînt cromoproteide care conțin în structura lor un ion de fier legat într-un inel porfirinic. Ei funcționează ca transportori de electroni datorită transformărilor reversibile pe care le suferă fierul:

Citocrom oxidat (Fe^{3+}) + e^- ⇌ Citocrom redus (Fe^{2+}) — reacție redox care stă la baza funcției lor biologice de transelectronaze.

Citocromii sînt legați de diferite formațiuni infrastructurale ale celulei (microsomi, cloroplaste, mitocondrii). În mitocondriile organismelor superioare au fost identificați cinci citocromi: *b*, *c*, c_1, *a* și a_3, iar la nivelul reticulului endoplasmatic alți doi citocromi: b_5 și P_{450}.

Clasificarea citocromilor se face în funcție de poziția benzilor de absorbție caracteristice stării lor reduse. Asemenea hemoglobinei, citocromii reacționează cu CO și cu cianurile. Complexul dintre citocromi și CO este, de asemenea, reversibil, sub acțiunea luminii. Ținînd seama de situsul celular al citocromilor, tratarea intoxicărilor cu CO se face prin administrarea de tiosulfat care oxidează anionul cianură la tiocianat. Deoarece albastrul de metilen suferă transformări redox la un potențial apropiat de cel al sistemului citocromic, administrarea acestui colorant poate furniza apariția unei căi artificiale de transport electronic, colaterală catenei respiratorii otrăvită cu CO.

Cu excepția citocromului *c* care este ușor solubilizat din preparatele mitocondriale, ceilalți citocromi sînt puternic legați de structurile membranare ale acestor infrastructuri celulare. Citocromul *c* a fost izolat, purificat și cristalizat din multe surse biologice, caracterizat fizico-chimic, i s-a determinat secvența resturilor de aminoacizi și structura terțiară. Sistematicienii îmbrățișează ideea utilizării secvenței primare a acestei cromoproteide în stabilirea evoluției unor specii. În structura citocromului *c*, gruparea Fe-protoporfirină este legată covalent de proteină. Se stabilesc legăturile tioeterice prin adiția a două grupări SH aparținînd resturilor de cisteină (*Cys*—14 și *Cys*—17) din structura proteinei la dublele legături

ale grupărilor vinil (C_2 și C_4) din nucleul porfirinic. Pozițiile a cincea și a șasea de coordinare a fierului sînt ocupate de resturi de histidină și respectiv de metionină, care împiedică reacția citocromului *c* cu oxigenul sau monooxidul de carbon, la *p*H 7. Aceste legături apoenzimă-grupare prostetică se stabilesc datorită structurii helicate a primei și induc o lipsă de reactivitate.

Citocromul c_1 are o structură chimică asemănătoare cu cea a citocromului *c* și gruparea prostetică este legată de apoenzimă prin aceleași punți tioeterice. Spre deosebire de citocromul *c*, care este ușor solubil, separarea citocromului c_1 în soluție are loc numai cu ajutorul detergenților.

Citocromul *b* este o heteroproteidă ferm legată de membrana mitocondrială care conține ca grupare prostetică hemul. Nu s-a precizat dacă această transelectronază intervine pe calea principală a transportului de electroni (înaintea citocromului *c*) sau face parte dintr-o cale auxiliară. În citocromii *b* și *a*, inelul porfirinic este asociat necovalent, putînd fi ușor disociat prin tratare cu acizi sau solvenți organici.

Citocromii *a* și a_3 la animale și la plante se găsesc întotdeauna legați și constituie unitatea funcțională numită *citocrom oxidaza* (denumire veche — ferment respirator al lui Warburg). Este o cromoproteidă ce conține o altă grupare prostetică decît protoporfirina și anume porfirina *A* (denumiri vechi — citohemina și hemina [*a*) care diferă de prima prin aceea că conține o grupare formil în poziția 8, un lanț izoprenoidic de 15 atomi de carbon în poziția 2 și-i lipsește gruparea metil din poziția 5. A cincea poziție de coordinare a fierului este legată de gruparea amino a unui aminoglucid din structura apoenzimei. Citocrom oxidaza în stare oxidată acceptă electronii de la citocromul *c*, pe care-l oxidează. În stare redusă, enzima respiratorie reacționează cu oxigenul molecular reoxidîndu-se. Sistemul citocrom *a* + citocrom a_3 este o enzimă cu o masă moleculară de 240 000, constînd din șase subunități identice, fiecare conținînd cîte un atom de cupru și cîte o grupare prostetică. Din cele șase subunități, două prezintă proprietăți spectrale distincte și au fost denumite citocrom *a*, celelalte patru constituind citocromul a_3. Din aceste forme, numai citocromul a_3 este autooxidabil, adică reacționează direct cu oxigenul. Forma redusă a citocromului a_3 are o deosebită afinitate pentru oxigenul adus de hemoglobină, astfel este suficientă o concentrație de numai 5% O_2 pentru a satura enzima în acest substrat. El participă la reacția :

$$2\ \text{cit.}a_3(Fe^{2+}) + 1/2\ O_2 \longrightarrow 2\ \text{cit.}\ a_3(Fe^{3+}) + O^{2-}$$

Forma activată a oxigenului, O^{2-} reacționează cu protonii H^+ care părăsesc catena respiratorie, la nivelul sistemului redox ubichinonă-ubihidrochinonă, pentru a trece în matricea mitocondrială :

$$2H^+ + O^{2-} \longrightarrow H_2O$$

reacția de formare a apei fiind spontană datorită marii reactivități a reactanților. Este posibil ca electronii să fie primiți întîi de citocromul *a* și apoi să fie transferați citocromului a_3 care reprezintă oxidaza finală a catenei respiratorii. Se pare că atomii de cupru sînt esențiali pentru func-

ţia biologică de transport al electronilor deoarece studiile de rezonanţă electronică de spin indică reacţia redox:

$$Cu^{2+} + e^- \rightleftharpoons Cu^+$$

Unele caracteristici moleculare ale citocromilor catenei respiratorii mitocondriale sînt prezentate în tabelul 16.5, iar structura grupării lor prostetice redată în figura 16.4.

TABELUL 16.5

Unele caracteristici moleculare comparative ale unor citocromi izolaţi din mitocondrii

Citocrom	*b*	c_1	*c*	*a*	a_3
Masa moleculară	30 000	370 000	13 000	— 240 000 —	
Grupare prostetică	Un mol de protoporfirină IX	Un mol de hem C/monomer	un mol de hem C	Şase moli de hem *A*, 1—2 atomi cupru	
Maxime de absorbţie (nm)	563 532 429	554 524 418	550 521 415	600 603,5	439 443

În concluzie secvenţele de reacţii, componente ale catenei respiratori sînt:

$$DH_2 + NAD^+ \rightleftharpoons D + NADH + H^+$$

$$NADH + H^+ + E_1\text{—}FMN \rightleftharpoons NAD^+ + E_1\text{—}FMNH_2$$

$$E_1\text{—}FMNH_2 + Ub_{ox} \rightleftharpoons E_1\text{—}FMN + Ub_{red} + 2\ H^+$$

$$Ub_{red} + 2\ Cit.\ b\ (Fe^{3+}) \rightleftharpoons Ub_{ox} + 2\ Cit.\ b\ (Fe^{2+})$$

$$2\ Cit.\ b\ (Fe^{2+}) + 2\ Cit.\ c\ (Fe^{3+}) \rightleftharpoons 2\ Cit.\ b\ (Fe^{3+}) + 2\ Cit.\ c\ (Fe^{2+})$$

$$2\ Cit.\ c\ (Fe^{2+}) + 2\ Cit.\ a\ (Fe^{3+}) \rightleftharpoons 2\ Cit.\ c\ (Fe^{3+}) + 2\ Cit.\ a\ (Fe^{2+})$$

$$2\ Cit.\ a\ (Fe^{2+}) + 2\ Cit.\ a_3(Fe^{3+}) \rightleftharpoons 2\ Cit.\ a\ (Fe^{3+}) + 2\ Cit.\ a_3\ (Fe^{2+})$$

$$2\ Cit.\ a_3(Fe^{2+}) + 1/2\ O_2 + 2\ H^+ \rightleftharpoons 2\ Cit.\ a_3(Fe^{3+}) + H_2O$$

Sistemul enzimatic al catenei respiratorii a fost pus în evidenţă pe fragmentele mitocondriale obţinute prin distrugerea parţială a acestor infrastructuri şi prin fracţionarea lor. G r e e n separă patru complecşi:

$$NADH + H^+ + Ubichinonă \xrightarrow{①} NAD^+ + Ubihidrochinonă$$

$$Succinat + Ubichinonă \xrightarrow{②} Fumarat + Ubihidrochinonă$$

$$Ubihidrochinonă + 2\ Cit.\ c\ (Fe^{3+}) \xrightarrow{③} Ubichinonă + 2\ Cit.\ c\ (Fe^{2+})$$

$$2\ Cit.\ a_3(Fe^{2+}) + 1/2\ O_2 \xrightarrow{④} 2\ Cit.\ a_3(Fe^{3+}) + O^{2-}$$

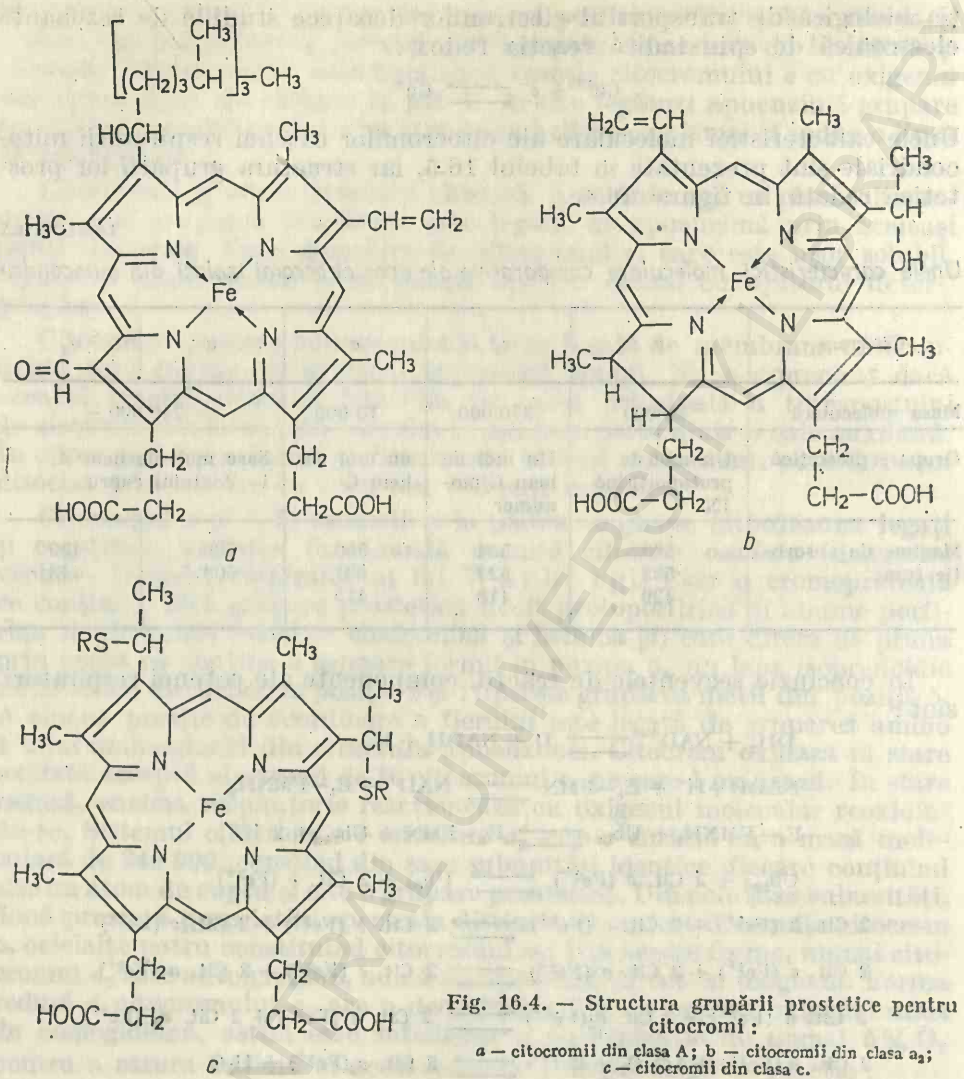


Fig. 16.4. — Structura grupării prostetice pentru citocromi :
a — citocromii din clasa A; b — citocromii din clasa a_3;
c — citocromii din clasa c.

În studiul componentelor catenei respiratorii sînt utilizaţi inhibitori specifici de tipul izoamiletilbarbituratului de sodiu *(amital)*, care blochează transferul de electroni de la NAD la citocromul *b*, a *rotenonului*, care inhibă NADH dehidrogenaza, *antimicinei A* antibiotic izolat din *Streptomyces*, care inhibă transferul de electroni de la citocromul *b* la citocromul *c*, cianurilor şi monooxidului de carbon care inhibă citocromoxidaza etc.

Ordinea componentelor în catena respiratorie, modul de intrare a diferitelor substrate, furnizate de metabolismul glucidic, lipidic şi proteic, şi de participare a lor la oxidarea biologică sînt prezentate în figura 16.5.

În plantele superioare au fost identificaţi şi alţi citocromi localizaţi în microzomi, mitocondrii şi cloroplaste, dar nu au fost obţinuţi în stare

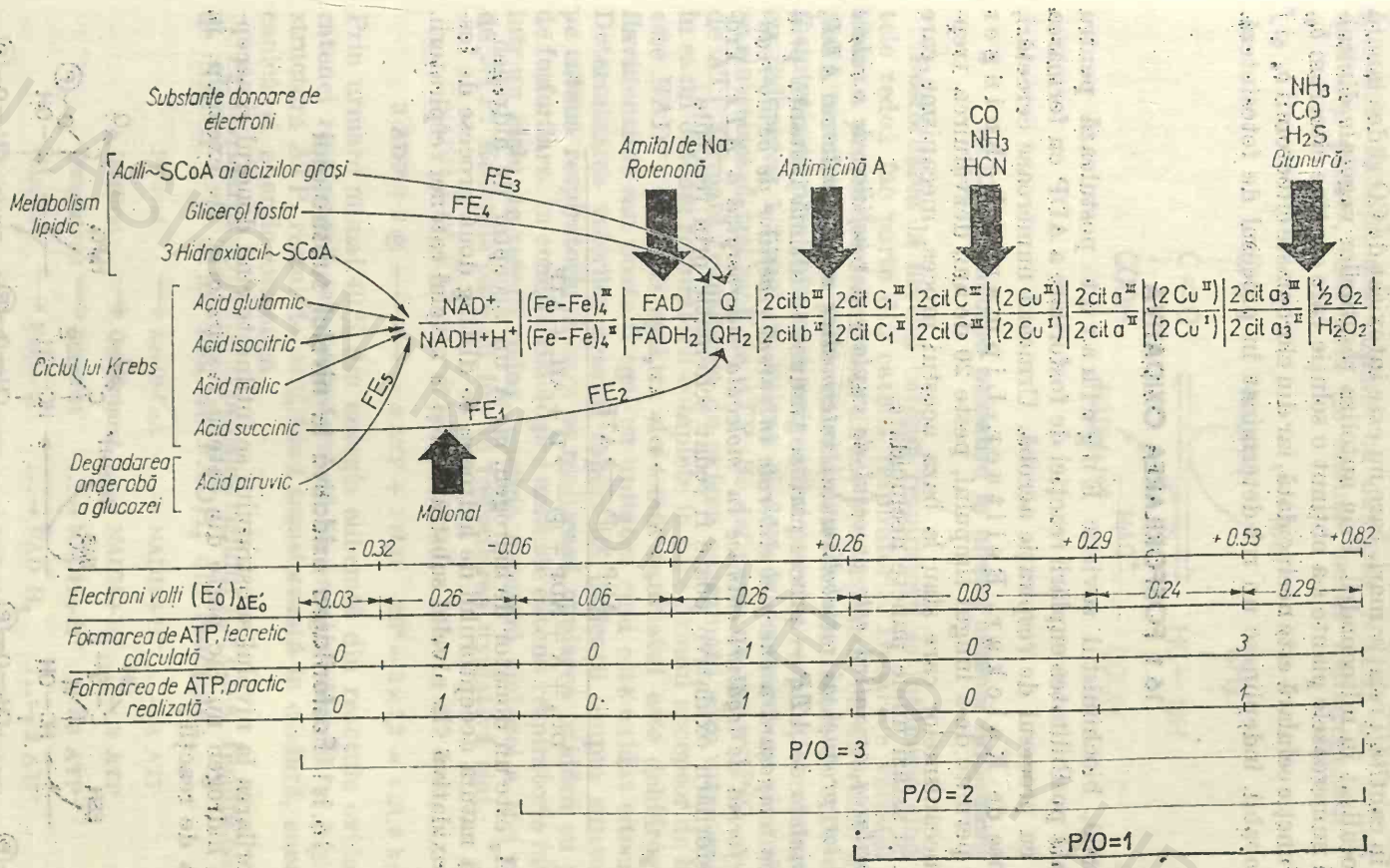


Fig. 16.5. — Schema catenei respiratorii. Sînt indicate componentele catenei respiratorii, potențialele lor redox, locul acțiunii inhibitorilor specifici și situsurile de fosforilare.

pură. Astfel, din *Arum* și *Symplocarpus foetidus* s-a izolat citocromul b_7, prezent în cantități relativ mari, care nu este intoxicat de CO și de cianură și este localizat în mitocondrii. Prin autoliza țesuturilor vegetale din microsomii numeroasele plante s-a obținut o soluție care conține citocrom b_3, a cărui funcție celulară este neelucidată, iar din cloroplaste citocromii b_6 și f care, probabil, îndeplinesc un rol determinat în procesul de fotosinteză.

16.1 FOSFORILAREA OXIDATIVĂ

În 1930, biochimistul sovietic Engelhardt postulează pentru prima dată posibilitatea cuplării reacției de fosforilare a ADP cu formarea de ATP cu procesul de respirație aerobă. Urmează numeroase cercetări, întreprinse de Kalckar, Belitser, Lipmann, Lehninger care vor permite de-a lungul timpului, peste 20 de ani, dezvăluirea treptată a mecanismelor care stau la baza acestui proces, mecanisme care prezintă și astăzi unele puncte neelucidate.

Fosforilarea oxidativă este procesul de cuplare a reacțiilor de oxidare a diferiților produși ai metabolismului intermediar cu fosforilarea ADP, deci cu sinteza de ATP — proces care se traduce în ultimă instanță *prin înglobarea temporară a energiei eliberate în cursul reacțiilor de oxido-reducere sub formă de legături chimice în molecula macroergică a ATP.* Procesul fosforilării oxidative poate fi redat schematic prin reacțiile:

$$DH_2 + A \longrightarrow D + AH_2$$

$$ADP + Ⓟ \longrightarrow ATP$$

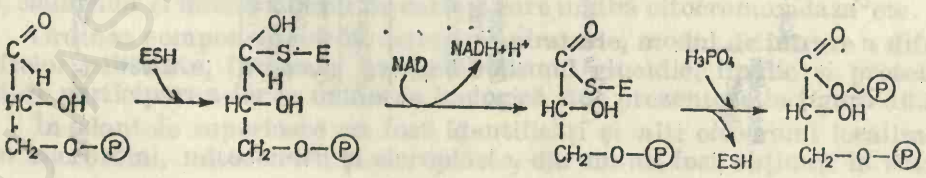
$$DH_2 + A + ADP + Ⓟ \longrightarrow D + AH_2 + ATP,$$

unde DH_2 este un donator de hidrogen, iar A un acceptor de hidrogen.

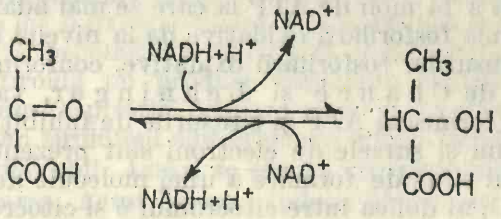
După natura acceptorului de hidrogen se disting două procese de fosforilare oxidativă: la nivelul substratului și la nivelul catenei respiratorii.

16.1.1 Fosforilarea oxidativă la nivelul substratului

Fosforilarea la nivelul substratului se întîlnește cînd donorul și acceptorul de hidrogen nu fac parte din catena respiratorie. De exemplu, în secvența de reacții:



catalizată de *3-fosfogliceraldehiddehidrogenaza*, din cadrul procesului de glicoliză. Reacția este cuplată cu oxidarea NADH din ultima etapă a aceluiași proces, catalizată de enzima lactat dehidrogenaza



16.1.2 Fosforilarea oxidativă la nivelul catenei respiratorii

Fosforilarea la nivelul catenei respiratorii se întîlnește cînd substratele redox fac parte din catena respiratorie. Deoarece variația energiei libere a proceselor redox este direct proporțională cu diferența de potențial a reactanților, se poate calcula teoretic cantitatea de ATP ce poate fi sintetizată prin reducerea oxigenului pe calea respirației celulare. Odată cu reducerea 1/2 mol de oxigen și deci cu formarea unui mol de apă se sintetizează trei moli de ATP. Se definește un raport P/O, cantitatea de ATP formată / cantitatea de oxigen consumată care este egal cu trei în cazul catenei respiratorii complete în care primul acceptor de hidrogen este NAD^+; poate fi egal cu doi cînd succinatul este dehidrogenat de flavinenzime sau poate fi egal cu unitatea cînd este oxidat citocromul *c*. Determinarea valorilor acestui raport dă indicații asupra situsurilor de pe catena respiratorie în care se realizează cuplarea oxidării cu procesul de fosforilare. În condiții fiziologice normale catena respiratorie furnizează într-un ciclu de reacții redox, energia necesară sintezei a trei molecule de ATP. Reacțiile care au loc în fosforilarea oxidativă sînt :

$$NADH + H^+ + 1/2\ O_2 \longrightarrow NAD^+ + H_2O \qquad \Delta G^\circ = -52{,}7 \text{ kcal}$$

$$3\ ADP + 3\ \textcircled{P} \longrightarrow 3\ ATP + 3\ H_2O \qquad \Delta G^\circ = 3 \times 7{,}3 = +21{,}9 \text{ kcal}$$

Prin urmare numai 40 % din energia eliberată din reacțiile oxidative ale catenei respiratorii este transformată în energie chimică și înglobată în structura ATP, restul de 60 % fiind transformată în căldură, energie mecanică și energie osmotică.

Prin oxidarea piruvatului pe calea ciclului K r e b s, rezultă patru moli de NADH + H și un mol de $FADH_2$ din reacțiile :

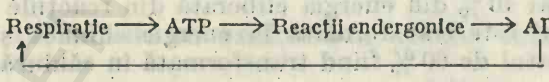
Piruvat	⟶ Acetil-CoA	...→ $NADH+H^+$	...→ 3 ATP
Izocitrat	⟶ Oxoglutarat	...→ $NADH+H^+$	...→ 3 ATP
Oxoglutarat	⟶ Succinat	...→ $NADH+H^+$	...→ 3 ATP
Succinat	⟶ Fumarat	...→ $FAD\ H_2$	...→ 2 ATP
Malat	⟶ Oxaloacetat	...→ $NADH+H^+$	...→ 3 ATP

care intră în catena respiratorie suferind reacții oxidative. Prin cuplarea oxidării cu fosforilarea din cei patru moli de NADH + H^+, rezultă 4×3 moli = 12 moli ATP, iar din 1 mol de $FADH_2$ rezultă $1 \times 2 = 2$ moli ATP. Prin urmare fosforilarea oxidativă la nivelul catenei respiratorii conduce la sinteza a 14 moli de ATP la care se mai adaugă un mol ATP biosintetizat în urma fosforilării oxidative de la nivelul substratului.

Localizarea situsurilor fosforilării oxidative, conform rezultatelor cercetărilor conduse de Chance și Lehninger, valorile E_0' și $\Delta E_0'$, etapele în care se formează ATP și situsurile de inhibiție a transportului de electroni precum și sursele de electroni sînt prezentate schematic în figura 16.5. Primul situs de formare a unei molecule de ATP este situat între NAD și FAD, al doilea între citocromul *b* și citocromul c_1, al treilea între citocromul *c* și citocromul *a*. Localizarea lor s-a făcut cu ajutorul inhibitorilor specifici — amitalul, antimicina și cianura care acționează diferențiat.

Klingenberg demonstrează reversibilitatea reacțiilor care au loc în cadrul catenei respiratorii — procesul invers este endergonic și probabil utilizează energia eliberată în urma hidrolizei unor compuși macroergici de tip ATP.

În cadrul catenei respiratorii se stabilește un echilibru dinamic între concentrațiile diferitelor substrate reduse, cantitatea de oxigen furnizat de hemoglobină și viteza proceselor de fosforilare. Factorul determinant pentru echilibrul dinamic al catenei respiratorii este reprezentat în ultimă instanță de concentrația în ADP de la nivelul mitocondriei. Energia eliberată din aceste procese redox permite să aibă loc reacția dintre ADP și fosfatul anorganic cu formarea ATP. În cazul unor concentrații mai mari de ADP, o cantitate mai mare de substrat redus este oxidată în aceeași unitate de timp, sînt transportați mai mulți electroni, consumul de oxigen (respirația celulară) este mai mare și se realizează o sinteză de ATP cu o viteză crescută. Creșterea concentrației de ATP induce scăderea cantității de ADP — substanța cheie care limitează viteza întregului proces și tabloul transformărilor metabolice se modifică. În celulă concentrația în ATP scade deoarece acesta se consumă în cadrul reacțiilor endergonice sau în travaliul muscular, se eliberează ADP care reinduce creșterea ratei respirației celulare. Astfel, respirația se adaptează nevoilor energetice ale celulei. Schematic, acest mecanism de feedback pozitiv poate fi redat astfel:



Substanțele care inhibă formarea ATP fără a afecta viteza cu care au loc reacțiile din catena respiratorie poartă numele de *agenți decuplanți ai fosforilării oxidative*. Studiul acestui proces deosebit de complicat a fost mult facilitat prin utilizarea unor substanțe care au furnizat informații prețioase asupra mecanismelor implicate. Agenții decuplanți, *2,4-dinitrofenolul*, *dicumarolul*, nu inhibă respirația celulară, dar împiedică fosforilarea; antibioticele *gramicidina* și *valinomicina* au aceeași acțiune ca primii, numai că necesită cationi monovalenți (de exemplu, K^+) pentru a-și face manifest efectul decuplant. Antibioticele *oligomicina*, *rutamicina* și *aurovertina* inhibă în același timp și respirația și fosforilarea. Posibili-

tatea cuplării și decuplării celor două procese are o semnificație fiziologică majoră, organismul putînd dirija prin cuplare acumularea de ATP sau prin decuplare — producerea de căldură. Într-adevăr, animalele de laborator ținute la temperaturi scăzute realizează o decuplare a procesului de fosforilare, are loc o oxidare liberă nefosforilantă care conduce la producerea de căldură necesară termoreglării organismului.

Cînd glanda tiroidă nu produce suficiente cantități de *tiroxină* și *triiodtironină*, viteza respirației celulare scade și invers cînd concentrațiile acestor doi hormoni tiroidieni sînt crescute, viteza acestei secvențe metabolice crește considerabil. Astăzi se știe că tiroxina stimulează respirația decuplînd fosforilarea. Acest hormon induce biosinteza unei flavinenzime mitocondriale, glicerol-3-fosfat dehidrogenaza care participă la mecanismul „suveică" de transport a echivalenților de reducere prin membrana mitocondriei.

16.1.3 Mecanismul fosforilării oxidative

Deși fosforilarea oxidativă este studiată de aproximativ 40 de ani, nu cunoaștem în amănunt mecanismul cuplării proceselor de fosforilare cu oxido-reducerile din catena respiratorie. În cele ce urmează vor fi expuse trei teorii emise în legătură cu acest proces.

Teoria chimică, elaborată de S l a t e r presupune existența unor situsuri de cuplare C_1, C_2, C_3 (figura 16.6) care sînt inhibate în mod specific de amital, de antimicină și respectiv, de cianură. Acești factori de cu-

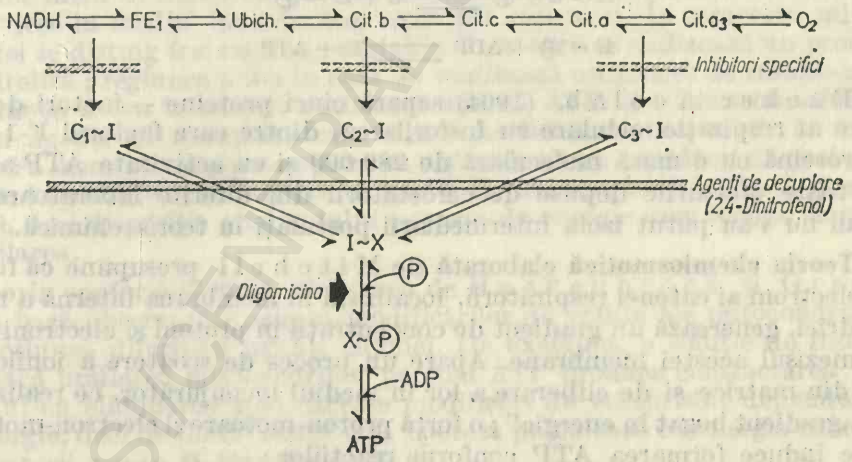


Fig. 16.6. — Teoria chimică a cuplării fosforilării cu catena respiratorie.

plare C se combină cu un intermediar ipotetic I, comun pentru cele trei situsuri formînd compuși de tipul C~I. Agenții decuplanți de tipul 2,4-dinitrofenolului reacționează la acest nivel, inducînd hidroliza compușilor

de tip C~I. Energia legăturii macroergice este cedată unui al doilea intermediar ipotetic X, printr-o reacție de schimb :

$$C \sim I + X \rightleftharpoons C + I \sim X$$

I~X reacționează cu ortofosfatul cu eliberarea intermediarului

$$I \sim X + Ⓟ \rightleftharpoons I + X \sim Ⓟ$$

I și formarea unui alt compus macroergic X ~ Ⓟ, reacție inhibată de antibioticul oligomicina. În continuare,

$$X \sim Ⓟ + ADP \rightleftharpoons X + ATP$$

legătura macroergică este înglobată în structura ATP care este transferat în exteriorul mitocondriei.

L e h n i n g e r (1978) susținător al teoriei chimice asupra cuplării fosforilării cu catena respiratorie, completează ipoteza în felul următor : un purtător de electroni redus I_{red} se leagă de un factor de cuplare C, în prezența unui oxidant, Y :

$$I_{red} + C + Y_{ox} \longrightarrow I_{ox} \sim C + Y_{red},$$

cînd în urma unui proces redox se formează o legătură macroergică în compusul $I_{ox} \sim C$, care reacționează cu o enzimă E de formare a ATP conform reacțiilor :

$$I_{ox} \sim C + E \rightleftharpoons I_{ox} + E \sim C$$

$$I_{ox} + Y_{red} \rightleftharpoons I_{red} + Y_{ox}$$

$$E \sim C + Ⓟ \rightleftharpoons C + E \sim Ⓟ$$

$$E \sim Ⓟ + ADP \rightleftharpoons E + ATP$$

R a c k e r și c o l a b. (1964) separă cinci proteine — factori de cuplare ai respirației celulare cu fosforilarea, dintre care factorul F-1 este o proteină cu o masă moleculară de 280 000 și cu activitate ATP-azică. Cu toate eforturile depuse de cercetătorii din diferite laboratoare ale lumii nu s-au putut izola intermediarii postulați în teoria chimică.

Teoria chemiosmotică elaborată de M i t c h e l l presupune că fluxul de electroni ai catenei respiratorii, localizată în membrana internă a mitocondriei, generează un gradient de concentrații în protoni și electroni de-a curmezișul acestei membrane. Apare un proces de scoatere a ionilor de H^+ din matrice și de eliberare a lor în mediul înconjurător, ce realizează un „gradient bogat în energie" ; o forță proton-motoare și electron-motoare care induce formarea ATP conform reacțiilor :

$$ADP + Ⓟ \rightleftharpoons ATP + 2\,H^+ + O^{2-}$$

$$2\,H^+ + O^{2-} \rightleftharpoons H_2O$$

$$ADP + Ⓟ \rightleftharpoons ATP + H_2O$$

este postulată prin prezența unei ATP-aze „reversibile", „translocatoare de protoni", legată de membrana internă. Pentru ca reacția de fosforilare a ADP, cu formare de ATP și apă să aibă loc este necesară o energie de 7,3 kcal. Pentru ca echilibrul acestui sistem reversibil să fie deplasat spre sinteza de ATP trebuie eliminată din sistem apa, conform principiului

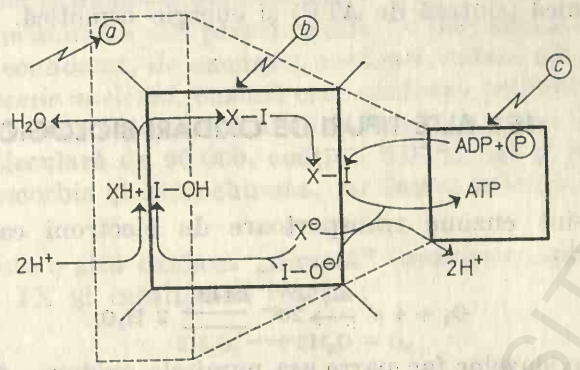


Fig. 16.7. — Schema teoriei chemioosmotice a lui Mitchell.

a. suprafața intermediară; b. membrana mitocondrială internă; c. matrice.

Le Chatelier. ATP-aza postulată de Mitchell este capabilă de a îndepărta apa din sistemul ADP + Ⓟ cu ajutorul unor intermediari X și I (fig. 16.7) — alții decît cei din teoria chimică :

$$ADP + Ⓟ + X \sim I \rightleftharpoons ATP + X^- + I - O^- + 2H^+.$$

Protonii intră în matricea mitocondriei unde *p*H este bazic, iar anionul $I—O^-$ iese în mediul înconjurător unde *p*H este acid. În structura mitocondriei se disting trei regiuni : regiunea 1, în care se realizează un proces de hidroliză ; regiunea a 2-a în care se realizează un proces de translocare și regiunea a 3-a în care se realizează sinteza ATP. 2,4-Dinitrofenolul și ceilalți agenți de decuplare care sînt liposolubili sînt absorbiți în faza lipidică a membranei și pot acționa ca niște adevărați purtători de protoni, realizînd egalizarea concentrațiilor ionilor H^+ de-o parte și de alta a membranei, deci dispariția gradientului — sursa de energie care realiza efectiv fosforilarea.

Teoria conformațională elaborată de Hackenbrock și Green are la bază observațiile asupra modificărilor de volum ale mitocondriilor sub acțiunea diferiților agenți chimici. De exemplu, o soluție de fosfați provoacă umflarea mitocondriilor pe cînd ATP produce contractarea volumului cu eliminarea apei. Aceste modificări de volum sînt dependente de energie, deci de fluxul electronic. Ipoteza postulează că energia catenei respiratorii poate fi transformată în :

— energie chimică (înglobată în molecula macroergică a ATP) ;

— energie osmotică (necesară acumulării de ioni) ;

— energie mecanică (necesară modificărilor conformaționale ale membranelor mitocondriale).

Autorii au demonstrat electronomicroscopic că mitocondriile au structuri diferite în absența ADP și în prezența lui, trecerea de la o conformație la alta efectuîndu-se foarte repede. Se postulează că energia catenei respiratorii induce în mitocondrii instalarea unei stări conformaționale bogate în energie, cînd energia conformațională este transformată în energie chimică (sinteză de ATP) și energie osmotică.

16.2 ALTE TIPURI DE OXIDĂRI BIOLOGICE

Oxidazele sînt enzime transportoare de electroni care catalizează reacții de tipul:

$$O_2 + 4\ e^- \longrightarrow 2O^{2-} \overset{+4H^+}{\rightleftharpoons} 2\ H_2O.$$

Din categoria oxidazelor fac parte așa-numitele oxidaze „directe": *peroxidaza, catalaza, ascorbatoxidaza, fenoloxidazele, glioxilatoxidaza* și *aminooxidaza*. Singura enzimă din catena respiratorie care reacționează direct cu oxigenul este *citocrom oxidaza*, care transportă 4 electroni cu formare de apă.

Peroxidaza, cromoproteidă larg răspîndită în regnul vegetal catalizează reacția:

$$DH_2 + H_2O_2 \longrightarrow D + 2H_2O$$

în care donorii de electroni pot fi diferiți compuși: fenoli, amine, endioli, aldehide, flavone, tirozină, citocrom *C* și diferite alte substanțe (acid uric, rezorcină, nitrit, NADH + H^+ și altele). Peroxidaza descompune apa oxigenată cu formare de complecși intermediari:

$$E - H_2O + H_2O_2 \rightleftharpoons E - H_2O_2 + H_2O$$

Complex I

$$E{-}H_2O_2 + DH_2 \longrightarrow \text{Complex II} + DH\bullet + H_2O$$

$$\text{Complex II} + DH\bullet + DH_2 \longrightarrow E - H_2O + D + DH_2$$

Unele peroxidaze pot cataliza diferite reacții de oxidare directă:

$$DH_2 + O_2 \longrightarrow D + H_2O_2 \quad \text{sau}$$

$$DH_2 + 1/2O_2 \longrightarrow D + H_2O$$

În experiențe *in vitro* s-a demonstrat că în prezența ionilor de Mn^{2+} și a rezorcinei peroxidaza poate oxida numeroși compuși ai metabolismului intermediar, de exemplu, NADH + H^+, NADPH + H^+, acid indolilacetic, acid oxalilacetic, triptofan ș.a. dar participarea directă *in vivo* a peroxidazei la procesele de oxidare nu a fost semnalată.

Citocrom C peroxidaza a fost izolată din levuri și din *Pseudomonas fluorescens* (Michlin, 1956, Lenhoff și Kaplan, 1953) și s-a

dovedit că este deosebită spectral de peroxidaza vegetală. Are o masă moleculară de 60 000, formează complecşi I şi II şi este inhibată de cianură, flor şi sulfiţi. Ea oxidează citocromul *c* redus în prezenţa peroxidului de hidrogen care se formează în urma acţiunii glucozo oxidazei, aldehid oxidazei şi oxidazei aminoacizilor.

În ţesuturile animale sînt prezente diferite peroxidaze al căror rol biologic rămîne necunoscut, de exemplu, *verdoperoxidaza* din leucocitele bolnavilor de *leucemie mieloidă*, enzimă care oxidează polifenolii, parafenilendiamina, acidul ascorbic, citocromul *c* ş.a., *lactoperoxidaza* izolată din lapte, cu o masă moleculară de 90 000, conţine 0,07% fier şi oxidează pirogalolul, acidul ascorbic şi hidrochinona, iar într-o măsură mult mai mică citocromul *c*.

Catalaza este o altă oxidază „directă" care are ca grupare prostetică protoporfirina IX şi catalizează reacţia:

$$2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$$

dar, spre deosebire de peroxidază poate cataliza şi reacţia:

$$CH_3CH_2OH + H_2O_2 \longrightarrow CH_3CHO + 2H_2O$$

Catalaza este o enzimă răspîndită aproape în toate celulele aerobe, însă cel mai bine studiată este catalaza izolată din ficatul animalelor obţinută şi în stare cristalină. Are o masă moleculară de aproximativ 300 000—500 000, pH_i la 5,4—5,7, şi absoarbe la 544—536, 506—500 şi 280—280 nm. Se consideră că în celulă catalaza îndeplineşte un rol de apărare scindînd peroxidul de hidrogen care se formează în mod normal, protejînd hemoglobina contra unor eventuale transformări oxidative pe care le poate provoca peroxidul de hidrogen eritrocitar sau la plante, apărînd clorofila contra degradărilor oxidative (M i c h l i n, 1960).

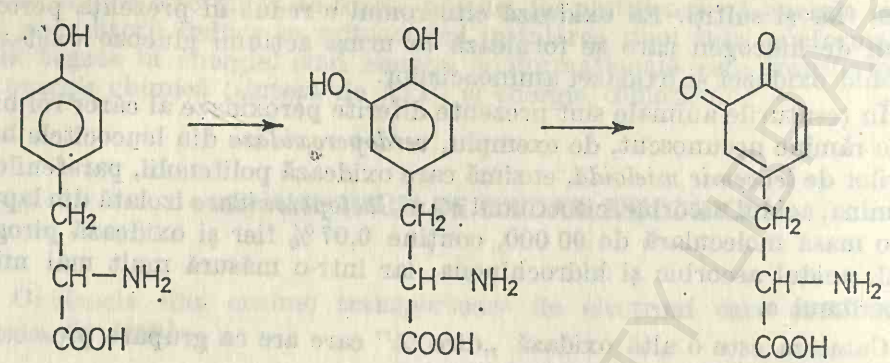
Ascorbat oxidaza este larg răspîndită la plante, unde se găseşte localizată în fracţia celulară solubilă şi legată de pereţii celulari; este o Cu^{2+} — enzimă care acţionează specific faţă de acidul ascorbic şi analogii structurali apropiaţi după un mecanism de reacţie necunoscut. Se presupune că ascorbatoxidaza în cursul reacţiei

$$\text{Acid ascorbic} + 1/2O_2 \longrightarrow \text{Acid dehidroascorbic} + H_2O$$

formează un compus intermediar, probabil, o semichinonă a *acidului monodehidroascorbic*. Preparatele de ascorbat oxidază au fost izolate din cele mai diferite surse vegetale (Cucurbita pepo condensa, castraveţi, varză, ardei ş.a.), conţin 0,26% Cu^{2+}, care poate fi îndepărtat numai după denaturarea enzimei şi au o masă moleculară de aproximativ 150 000.

Fenoloxidazele alcătuiesc o grupă de enzime cunoscute de mult timp, dar ale căror proprietăţi şi rol biologic continuă să rămînă necunoscute. Din această grupă fac parte *tirozinazale* care sînt monofenoloxidaze, *polifenoloxidaza* şi *laccaza* sau parapolifenoloxidaza. Tirozinaza, catalizează

reacția de transformare a aminoacidului tirozina la dihidroxifenilalanină (DOPA) pe care apoi o oxidează la o formă chinonică:



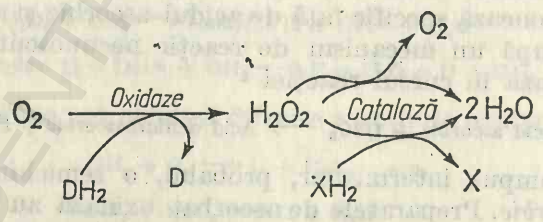
reacții care reprezintă primele două etape ale biosintezei melaninelor, pigmenți ai pielii și părului (v. și cap. 19). Difenolul este donorul de hidrogen, în final formîndu-se apa. „Dopa" oxidaza este o polifenoloxidază.

Alte oxidaze catalizează reacții de tipul:

$$O_2 + 2\ e^- \longrightarrow O_2^{2-} \underset{}{\overset{+2H^+}{\rightleftharpoons}} H_2O_2$$

în care are loc un transfer de numai doi electroni cu formare de peroxid de hidrogen. Enzimele de acest tip (aminoacid oxidaza, aldehid oxidaza etc.) sînt flavinenzime și catalizează dehidrogenarea unor substrate de către FAD, care în stare redusă transferă protonii oxigenului cu formarea H_2O_2. În vitro, sînt utilizați și alți acceptori de protoni (de exemplu, albastru de metilen) și se evită astfel formarea peroxidului de hidrogen.

În 1965, De Duve și Baudhuin descoperă niște particule respiratorii pe care le denumesc microcorpi (în limba engleză microbodies), *peroxizomi* și *glioxizomi* caracterizate prin asocierea a uneia sau a mai multor oxidaze generatoare de H_2O_2 cu cantități mari de catalază, care catalizează următoarele reacții:



Peroxizomii au capacitatea de a reduce oxigenul molecular la apă printr-un mecanism bifazic ce are ca intermediar H_2O_2. Donorii de hidrogen DH_2 pot fi *acidul uric*, *D-aminoacizii*, *L-aminoacizii*, *acidul glicolic* și *L-α-hidroxiacizii*, în funcție de tipul de celulă. Donorul de hidrogen din a doua fază a secvenței este H_2O_2 care este oxidat înapoi la oxigen într-o reacție catalitică sau reacționează cu un substrat XH_2 care poate fi metanolul, etanolul, formiatul, formaldehida, fenolii, ionii nitrit ce pot fi oxidați peroxidic de catalază. Peroxizomii sînt larg distribuiți în natură,

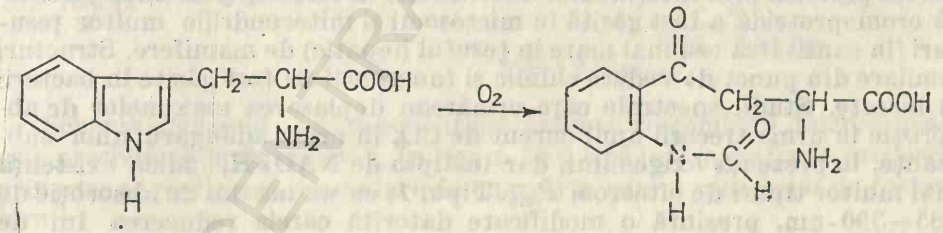
în regnul animal sau vegetal, dar sînt prezenți numai în acel tip de celule care-și sintetizează glucidele din precursori neglucidici. B r e i d e n b a c h și B e e v e r s (1973) au dat numele de *glioxizomi* unei noi structuri intracitoplasmatice, descoperită în semințele de „castor bean" germinate. *Glioxizomii* conțin un ciclu glioxilic complet care transformă grupările acetil din acetil-CoA la succinat. Glioxizomii sînt implicați în sinteza glucidelor din lipide. O relație dintre glioxizomi și peroxizomi a fost sugerată pentru prima dată de M ü l l e r și H o g g (1974) care au găsit două enzime cheie ce fac legătura — izocitrat liaza și malat sintaza, constituente ai peroxizomilor din *Tetrahymena pyriformis*. Această legătură este astăzi total confirmată prin faptul că glioxizomii din „castor bean" conțin catalază și glicolat oxidază. Prin urmare *glioxizomii sînt un caz particular de peroxizomi*. Legătura nu este reală întotdeauna deoarece enzimele ciclului glioxilic sînt absente în peroxizomii mamiferelor.

În microsomi, alte infrastructuri citoplasmatice, există alte două tipuri de enzime care catalizează reacții oxidative: *oxigenazele* și *hidroxilazele*. Microsomii se obțin *in vitro* prin ruperea structurilor membranare ale reticulului endoplasmic — rețea tubulară de natură lipoproteidică care se găsește răspîndită în întreaga citoplasmă. Se disting două forme ale reticulului endoplasmic: forma reticulată (rough — aspru) legată de ribozomi și o formă tubulară (smooth — netedă) bogată în enzime. Microsomii apar în urma omogenizării țesuturilor și deci a distrugerii celulelor, urmată de o centrifugare diferențială la 105 000 g, timp de o oră cînd această fracție particulată constituie sedimentul (pellet). Ei sînt sediul unor importante și complicate procese redox soldate cu hidroxilarea unor metaboliți.

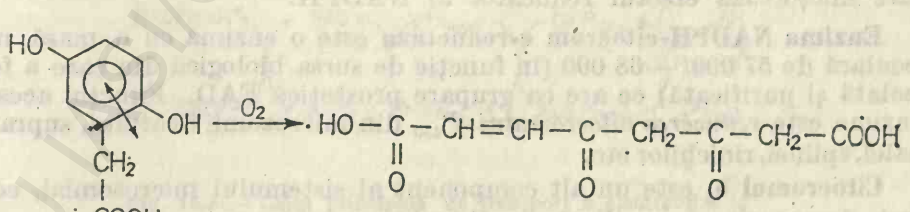
Oxigenazele sînt enzime care catalizează reacția generală:

$$A + O_2 \longrightarrow AO_2$$

unde A este substratul donor de electroni care poate fi triptofanul, acidul 3-hidroxiantranilic, acidul homogentizic etc.

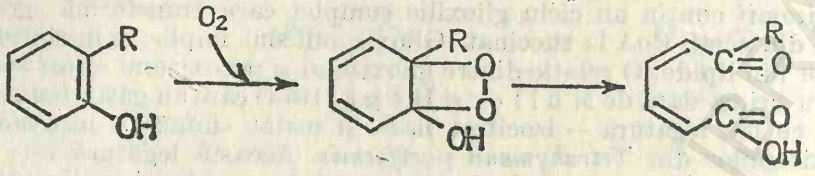


Triptofan *Formilkinurenina*



Acidul maleilacetoacetic

Mecanismul general constă în adiţia oxigenului la un ciclu aromatic soldată cu ruperea legăturii C=C şi cu formarea a două funcţiuni carbonil sau cu formarea unei funcţiuni carbonil şi a unei funcţiuni carboxil :



Hidroxilazele sînt enzime care catalizează reacţii generale de tipul :

$$AH + DH_2 + O_2 \longrightarrow AOH + D + H_2O$$

unde AH este substratul care va fi hidroxilat, iar DH_2 este donorul de hidrogen. Studii cu izotopi radioactivi (O^{18}) au arătat că din molecula de oxigen un atom este incorporat în substrat (AOH) şi cel de-al doilea este redus cu formarea apei, donorul de hidrogen oxidîndu-se.

Microzomii conţin o adevărată catenă transportoare de electroni capabilă de a utiliza oxigenul molecular pentru a oxida specific anumiţi metaboliţi. Catena microsomială conţine : *NADPH dehidrogenaze, flavin enzime, o feroproteidă nehemică* numită *adrenodoxină, citocromul* P_{450} şi citocromul b_5. În cele ce urmează vor fi analizate succint componentele mai bine studiate, localizate cu certitudine în catena respiratorie microsomială. *Citocromul* P_{450} reprezintă oxidaza terminală a catenei microsomiale şi îşi are denumirea de la faptul că în stare redusă are proprietatea de a se combina cu dioxidul de carbon formînd un complex cu un maxim de absorbţie la 450 nm. Are o activitate de *monooxigenază*, catalizînd oxidarea steroizilor, acizilor graşi etc. Citocromul P_{450} a fost izolat, purificat şi caracterizat fizico-chimic. Este o hemoproteidă cu o masă moleculară de aproximativ 50 000 ce conţine o grupare prostetică — *protoporfirina IX* legată de partea proteică prin intermediul unor resturi de cisteină şi histidină. Această cromoproteidă a fost găsită în microsomi şi mitocondriile multor ţesuturi (în cantitatea cea mai mare în ţesutul hepatic) de mamifere. Structuri similare din punct de vedere chimic şi funcţional au fost găsite în bacterii şi insecte. Studii spectrale care urmăreau deplasarea maximelor de absorbţie în urma trecerii unui curent de CO, în urma adăugării unor substanţe, în prezenţa oxigenului, dar în lipsa de NADPH, indică existenţa mai multor tipuri de citocrom P_{450}. Tipul *I*, cu un maxim de absorbţie de 385—390 nm, prezintă o modificare datorită căreia reducerea lui de NADPH este accelerată. Compuşii care produc tipul *II* sînt substrate slabe care micşorează efectul reducător al NADPH.

Enzima NADPH-citocrom c-reductaza este o enzimă cu o masă moleculară de 57 000 — 68 000 (în funcţie de sursa biologică din care a fost izolată şi purificată) ce are ca grupare prostetică FAD. Funcţia acestei enzime este *reducerea citocromului* P_{450} din microzomii ficatului, suprarenalei, splinei, rinichilor etc.

Citocromul b_5 este un alt component al sistemului microsomial, ce a fost descoperit şi purificat de Strittmatter.

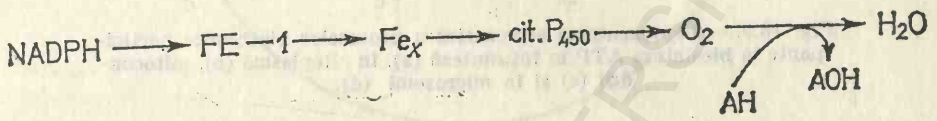
Catena respiratorie microsomială pornește de la NADPH și se încheie cu citocromul P_{450}. Metabolitul — substrat se combină cu citocromul P_{450} în stare oxidată și formează un complex care este redus de electronii proveniți de la NADPH. Complexul substrat-citocrom P_{450} redus se combină cu oxigenul molecular și se formează substratul hidroxilat, citocromul P_{450} oxidat și apa :

$$AH + Cit \cdot P_{450_{ox}} \longrightarrow AH\text{-}Cit \cdot P_{450_{ox}}$$

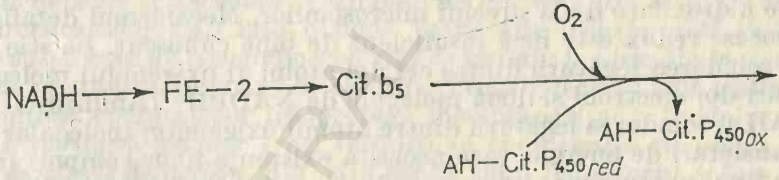
$$AH\text{-}Cit \cdot P_{450_{ox}} + 2\,e^- \longrightarrow AH\text{-}Cit \cdot P_{450_{red}}$$

$$AH\text{-}Cit \cdot P_{450_{red}} + O_2 + NADPH + H^+ \longrightarrow AOH + Cit \cdot P_{450_{ox}} + H_2O + NADP^+$$

Între NADPH și citocromul P_{450} se găsește flavinenzima (FE-1) NADPH--citocrom *c*-reductaza și probabil componenta Fe_x (adrenodoxina) a cărei existență este ipotetică, conform secvenței :



Citocromul b_5 face obiectul altor controverse privind catena respiratorie microsomială. Este probabil să existe o cale secundară care transferă electronii de la NADH la citocromul b_5 prin intermediul altei flavinenzime (FE-2) : NADH-citocrom-b_5-reductaza, cale care reprezintă un șunt pentru catena principală, importantă în reacțiile de reducere ale acidului ascorbic și în reacțiile de desaturare a acizilor grași :



Schema generală a componenților catenei respiratorii microsomiale este prezentată în figura 16.8. În figura 16.9 sînt însumate toate procesele prin care se realizează acumulare de energie în cursul proceselor de fosforilare.

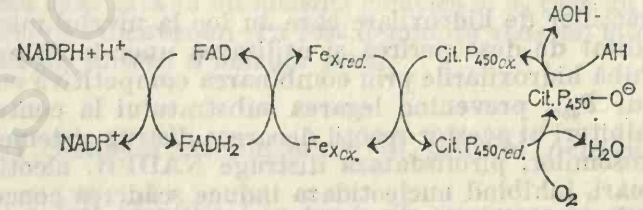


Fig. 16.8. — Calea principală de transport a electronilor la nivelul catenei respiratorii microsomiale.

Cercetări recente atestă asocierea proceselor de hidroxilare a diferiților metaboliți cu formarea unor compuși peroxidici ai acizilor grași superiori nesaturați (oleic, linoleic, arahidonic) prezenți în structurile membranare

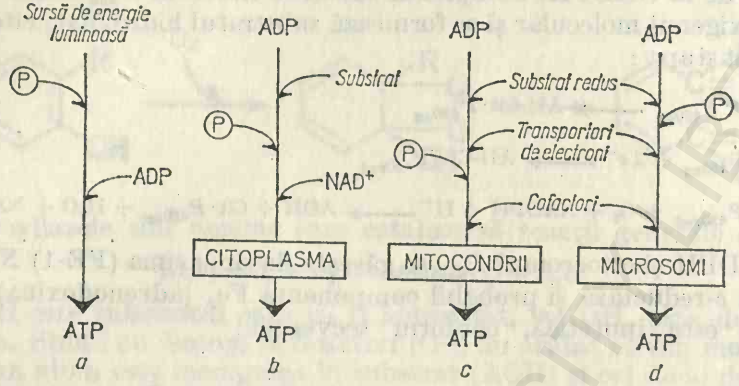


Fig. 16.9. — Reprezentarea schematică a proceselor biochimice participante la biosinteza ATP în fotosinteză (a), în citoplasmă (b), mitocondrii (c) și în microsomi (d).

ale microsomilor. În 1970, F r i d o v i c h atrage atenția asupra formării anionului superoxid O_2^- în cursul reacțiilor redox. Într-adevăr în organismele vii există o enzimă — *superoxid dismutaza* — capabilă să catalizeze reacția :

$$2O_2^- + 2H^+ \rightleftharpoons H_2O_2 + O_2$$

Enzima purificată din diferite surse biologice inhibă reacțiile de hidroxilare, iar prezența unor sisteme generatoare de superoxid stimulează reacțiile de hidroxilare de la nivelul microsomilor. Mecanismul detailat al acestor procese redox este încă insuficient de bine cunoscut. Se știe însă că pentru scindarea legăturii dintre cei doi atomi ai oxigenului molecular sînt necesari doi electroni și două molecule de NADPH. Labilizarea substratului AH și scindarea legăturii dintre atomii oxigenului molecular presupune transferuri de energie, care necesită existența unor compuși intermediari de tipul peroxizilor și superoxizilor, intermediari deosebit de reactivi care implică existența unor sisteme de protecție și de reglare. Legătura dintre acești intermediari se face prin intermediul glutationului redus, activator al sistemului generator de superoxid — xantin + xantin oxidază și agent reglator al producerii de peroxizi — datorită prezenței enzimei glutation peroxidaza.

Studiul reacțiilor de hidroxilare care au loc la nivelul microsomilor a fost mult facilitat de descoperirea și utilizarea unor inhibitori selectivi. Astfel, CO inhibă hidroxilările prin combinarea competitivă cu centrul *II* al citocromului P_{450}, prevenind legarea substratului la centrul *I*, detergenții sînt inhibitori ai acestor reacții deoarece distrug sistemele membranare ale microsomilor, pirofosfataza distruge NADPH, nicotinamida, în concentrații mari, inhibînd nucleotidaza induce scăderea concentrației de NADPH, dietilaminoetil difenilvaleratul acționează asupra citocromului P_{450} etc.

17

METABOLISMUL ACIZILOR GRAȘI ȘI PROSTAGLANDINELOR

17.1 BIOSINTEZA ACIZILOR GRAȘI

Glucoza procurată de organismele animale *din hrana ingerată* este parțial folosită pentru *acoperirea necesităților energetice imediate ale celulelor, țesuturilor și organismului*, parțial este *metabolizată cu formare de polizaharide care sînt depuse sub formă de rezerve în diferite organe și celule* (glicogenul hepatic și muscular, granulele de glicogen din celulele eucariotelor și procariotelor ș.a.) însă o bună parte este *transformată în acizi grași* care sub formă de triacilgliceroli sînt *depozitați*, la animale *în țesutul adipos* iar la plantele superioare *în semințe*. Triacilglicerolii sînt utilizați pentru biosinteza complecșilor lipoproteici membranari și a lipidelor complexe.

Majoritatea acizilor grași întîlniți în organismele vii conțin un număr par de atomi de carbon, din care cauză timp îndelungat a fost acreditată ideea că precursorii lor în procesul biosintezei trebuie să fie substanțe cu un număr par de atomi de carbon.

Biosinteza acizilor se realizează cel puțin *pe două căi diferite*. O cale de sinteză a fost evidențiată la nivelul *mitocondriilor și a fost denumită sistemul mitocondrial al sintezei acizilor grași*, spre deosebire de cea de a doua cale care este localizată în citoplasma celulară și la care nu participă nici mitocondriile, nici microzomi și a fost denumită *sistemul citoplasmatic sau amitocondrial* de sinteză a acizilor grași.

17.1.1 Sistemul citoplasmatic al sintezei acizilor grași

Sistemul a fost *identificat în țesuturile numeroaselor organisme* (ficat de porumbel, de pui și de șobolan, rinichi de șobolan), precum și la levuri și are ca *produs final un acid gras saturat*, care constituie prin-

cipalul acid gras întîlnit în cantități apreciabile în stare liberă în plasma sanguină, în compoziția numeroaselor și variatelor lipide simple și lipide complexe — *acidul palmitic.*

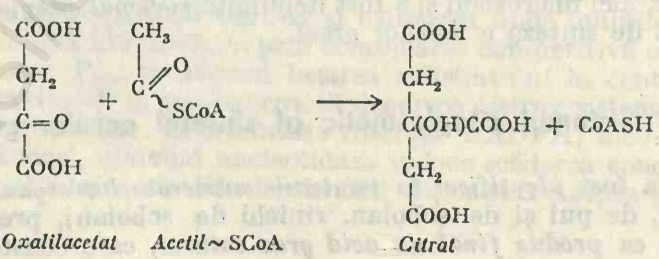
Dacă omogenatele țesuturilor enumerate sînt centrifugate pentru îndepărtarea microzomilor, mitocondriilor, nucleelor și resturilor membranelor celulare, fracția care se obține conține toate enzimele necesare pentru cataliza biosintezei acizilor grași din acetil~SCoA. *Trăsătura esențială a sistemului citoplasmatic al biosintezei acizilor grași este dependența lui totală de CO_2 (sau de bicarbonat), precum și necesitatea în ATP, ioni de Mg^{2+} sau Mn^{2+}, NADPH + H^+, biotină, sau prezența acidului citric.*

Acidul citric s-a dovedit necesar în experiențele *in vitro* și *in vivo* pentru asigurarea unei încorporări maxime a acetil~SCoA în acidul gras sintetizat la nivelul citoplasmei, deși acest compus nu servește nici ca material plastic pentru această sinteză, nici ca substanță reducătoare. Efectul stimulator al citratului asupra biosintezei acizilor grași este reprodus numai de NAD și de NADP, sub formă redusă. Pe de altă parte, s-a dovedit că ionul bicarbonat și dioxidul de carbon sînt necesari pentru biosinteza acizilor grași saturați cu catenă lungă de atomi de carbon de către ficat. Cercetările întreprinse de W a k i l și a l ț i i (1959) au demonstrat că este încorporat în urma unui proces de carboxilare enzimatică în structura malonil~SCoA, care este un precursor important în biosinteza acizilor grași.

Unitatea de bază a acizilor grași în sinteza lor la nivelul citoplasmei este acetatul activ, adică acetil~CoA, compus care rezultă atît din procesul de degradare oxidativă a acizilor grași, din acidul piruvic în metabolismul glucidelor, precum și din unii aminoacizi glucoformatori.

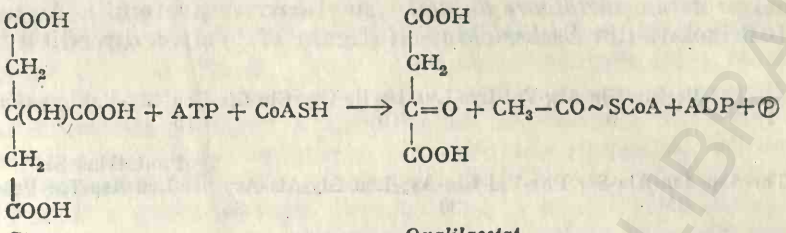
În prima etapă a sintezei are loc o carboxilare a acetil~CoA prin fixarea de CO_2 cu formare de *malonil-CoA*. Această reacție este catalizată de *acetil-CoA-carboxilaza*, în prezența ATP ionilor de Mg^{2+}, a CO_2 și a biotinei în calitate de grupare prostetică a enzimei. Ultima limitează viteza cu care acizii sînt sintetizați în citoplasma diferitelor celule eucariote și procariote.

Sursa moleculelor de acetil~SCoA utilizate în biosinteza acizilor grași cu catena formată din 14 — 16 atomi de carbon o constituie procesele de decarboxilare oxidativă a piruvatului și de β-oxidare a acizilor grași superiori care au ca sediu mitocondria. Membrana mitocondrială este însă impermeabilă pentru acetil~SCoA; transportul acesteia în citoplasmă unde se realizează biosinteza acizilor grași se face sub formă de acid citric ce ia naștere în cursul reacției:



Oxalilacetat *Acetil~SCoA* *Citrat*

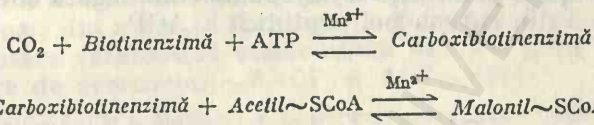
Membrana mitocondrială este permeabilă pentru acidul citric care trece din mitocondrie în citoplasma celulară unde în prezența unei enzime ATP dependente este scindat după reacția:



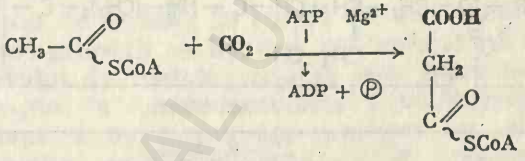
Citrat *Oxalilacetat*

În acest fel se explică acțiunea stimulatorie pe care acidul citric o are asupra biogenezei acizilor grași superiori: este un purtător de acetat de la nivelul mitocondriilor în citoplasmă. Îmbogățind conținutul citoplasmei cu acetil~CoA, sinteza acizilor grași este accelerată. Un rol de purtător al acetatului (sau de transportor) îl îndeplinește și *carnitina*, dar importanța ei pentru biosinteza acizilor grași superiori pare a fi minoră.

Formarea malonil~SCoA are loc în citoplasmă din acetil~CoA și dioxid de carbon, în prezența *biocitinei*, după următoarea reacție:



Reacția globală poate fi scrisă astfel:



Acetil~SCoA *Malonil*~SCoA

în care atomii dioxidului de carbon, scriși cu simboluri groase formează gruparea carboxil neesterificată a malonil~SCoA. Acetil~CoA carboxilaza, enzima care catalizează această reacție, nu posedă o specificitate absolută pentru acetil~SCoA deoarece poate carboxila și propionil~SCoA cu formare de metil-malonil~SCoA, dar este în schimb o *enzimă alosterică* acțiunea ei de carboxilare fiind stimulată de unii componenți ai *ciclului K r e b s*, acidul *α-cetoglutaric*, *acidul citric* și *acidul izocitric*. Proprietățile enzimei izolate din ficatul de pui de găină au făcut obiectul unor studii interesante, deoarece enzima se găsește în țesut sub două forme: *o formă inactivă* catalitic, cu o masă moleculară de 400 000 și alcătuită din patru subunități egale ca masă moleculară (100 000 fiecare); această formă denumită *protomer* posedă un *situs de legare a substratului*, în cazul de față acetil~SCoA, și un *situs de legare a izocitratului*, care are rolul de modulator pozitiv (stimulează activitatea catalitică).

Forma a doua, activă catalitic este polimeră, ia naștere numai în prezența izocitratului prin agregarea monomerilor și are o masă moleculară

de 4 000 000 daltoni, deci este alcătuită din 10 protomeri. Disocierea ei în protomeri depinde de concentrația izocitratului din mediul de reacție.

Etapa următoare în biosinteza acizilor grași este legată de acțiunea unei *proteine purtătoare de acil* („acyl carrier protein"). Această proteină a fost izolată din *Escherichia coli* (figura 17.1) și s-a dovedit a fi o proteină

Ser-Thr-Ile-Glu-Glu-Arg-Val-Lys-Lys-Ile-Ile-Gly-Glu-*Gln*-Leu-Gly-Val-Lys-*Gln*-Glu-Glu-Val-
1 5 10 15 20

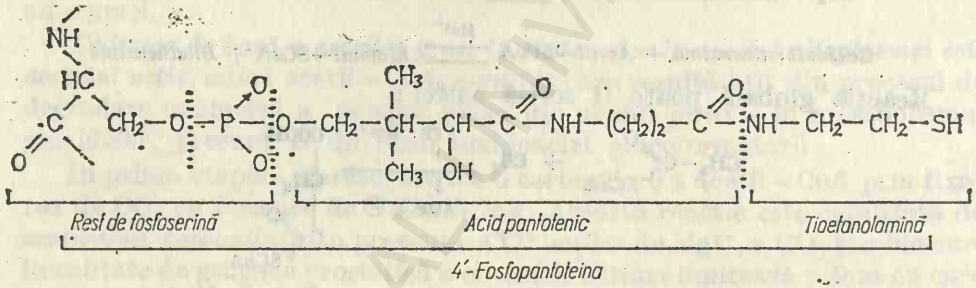
Ⓟ-Panteteină-SH
Thr-Asp-*Asn*-Ala-Ser-Phe-Val-Glu-Asp-Leu-Gly-Ala-Asp-Ser-Leu-Asp-Thr-Val-Glu-Leu-Val-
25 30 35 40

-Met-Ala-Leu-Glu-Glu-Glu-Phe-Asp-Thr-Glu-Ile-Pro-Asp-Glu-Glu-Ala-Glu-Lys-Ile-Thr-Thr-
45 50 55 60

-Val-*Gln*-Ala-Ala-Ile-Asp-Tyr-Ile-*Asn*-Gly-His-*Gln*-Ala
65 70 75 77

Fig. 17.1. — Structura primară a proteinei purtătoare de acil, izolată din *Escherichia coli* și locul inserției componentei prostetice panteteina.

solubilă, cu o masă moleculară de 1×10^4 daltoni și care conține în structură în calitate de grupare prostetică *4-fosfopantoteina*, legată covalent de un rest de fosfoserină din catena polipeptidică a ACP :



Gruparea funcțională a proteinei purtătoare de acil (ACP) este gruparea sulfhidril liberă care poate forma esteri cu diferiți radicali acil, de exemplu, cu acetilul și malonilul. În stare liberă ACP se notează ACP ~ SH.

Secvențele peptidelor 4'-fosfopanteteină izolate din diferite surse biologice și studiate de Vanaman și alții (1968), Matsumura și Stumpf (1968) și Roncari și alții (1972) și de Ayling și alții (1972) sînt redate în continuare iar resturile de aminoacizi scrise cursiv sînt identice cu cele din ACP izolat din celulele de *E. coli* :

E. coli : ...-Glu-Asp-Leu-Gly-Ala-Asp-[Ser]-Leu-Asp-Thr-Val-Glu-...

Ficat de șobolan : ...-Leu-Gly-Glx-*Gly*-Glu-*Asp*-[Ser]-Leu-.....

Levuri : ...-Lys-Gly-[Ser]-Val-Pro-Ala-....

Arthrobacter : ...-*Gly-Ala-Asp*-[Ser]-*Leu-Asp-Thr-Val-Glu*-...

Spanac : ...-Lys-*Gly-Ala-Asp*-[Ser]-*Leu-Asp-Thr-Val-Glu*-...

Restul de serină încadrat este legat covalent prin intermediul grupării hidroxil de 4'-fosfopanteteină. După cum se vede peptidele care conțin 4'-fosfopanteteină izolate din *E. coli*, *Arthrobacter* și din spanac conțin secvențe identice de aminoacizi situate în vecinătatea restului de *Ser* iar peptida din ficatul de șobolan este numai parțial asemănătoare cu cea din *E coli*.

În privința ACP izolat din *E. coli* a cărui structură primară a fost complet stabilită de V a n a m a n și a l ț i i (1968) se poate remarca caracterul ei acid datorită prezenței a patru resturi de *Asp* și a 14 resturi de *Glu*, din cele 77 resturi de aminoacizi din care este alcătuită. Pe de altă parte, predominanța resturilor de aminoacizi care au radicali ionizabili face din ACP o proteină tipic globulară cu o structură tridimensională, ceea ce poate juca un rol important în interacțiile dintre ACP-acil și diferite enzime din complexul multienzimatic al sintetazei acizilor grași.

Două enzime diferite, *malonil∼CoA : ACP-transacilaza* și *acetil∼CoA : ACP-transacilaza*, care sînt sulfhidril enzime, catalizează formarea de tioesteri ai ACP și eliberarea de CoASH :

$$\textit{Acetil}\sim\text{SCoA} + \text{ACP}\sim\text{SH} \rightleftharpoons \textit{Acetil}\sim\text{S}-\text{ACP} + \text{CoASH}$$

$$\textit{Malonil}\sim\text{SCoA} + \text{ACP}\sim\text{SH} \rightleftharpoons \textit{Malonil}\sim\text{S}-\text{ACP} + \text{CoASH}$$

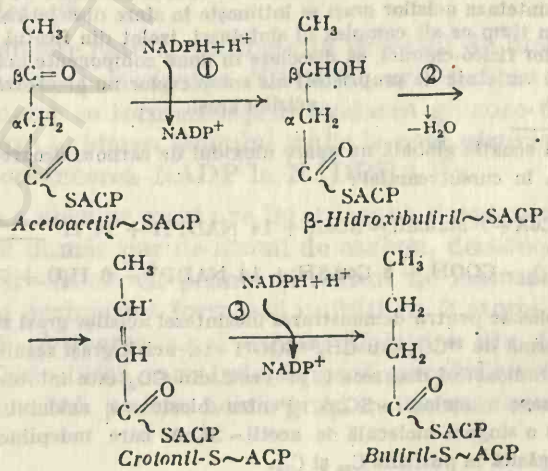
Cele două enzime fac parte din *complexul multienzimatic al sintetazei acizilor grași*, din care ACP nu poate fi izolat (figura 17.2). O enzimă de condensare catalizează condensarea acetil∼SACP și malonil∼SACP cu formare de acetoacetil∼SACP și ACP∼SH :

$$\text{Acetil}\sim\text{SACP} + \text{Malonil}\sim\text{S-ACP} \rightleftharpoons \text{Acetoacetil}\sim\text{SACP} + \text{ACP}\sim\text{SH}$$

$$\downarrow CO_2$$

și eliminare de dioxid de carbon. În cursul acestei reacții de condensare sînt eliminați atomii grupării carboxil a malonilului care proveneau în urma fixării dioxidului de carbon; reacția este puternic exergonică și deplasată spre dreapta, în sensul biosintezei acizilor grași.

Următoarele etape în biosinteză sînt catalizate de enzimele complexului sintetazei acizilor grași, *β-cetoacil∼ACP reductaza* (reacția *1*), *enoil∼ACP hidroxibutiril reductaza* (reacția 2), *enoil∼ACP reductaza* (reacția 3) :



Pentru sinteza unei molecule de *acid palmitic*, conform reacției globale *

$$\text{Acetil}\sim\text{SCoA} + 14\ \text{NADPH} + \text{H}^+ + 7\ \text{ATP} \longrightarrow \text{Acid palmitic} + 8\ \text{CoASH} + 14\ \text{NADP}^+ + 7\ \text{ADP} + 7\ \text{H}_3\text{PO}_4 + 6\ \text{H}_2\text{O}$$

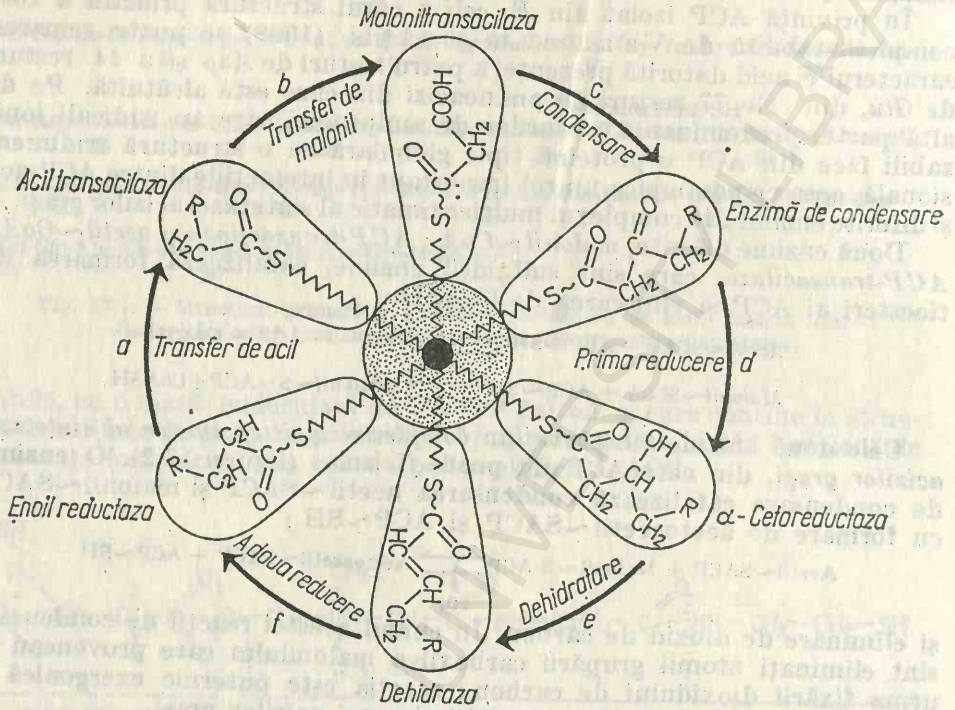


Fig. 17.2.— Modelul complexului *acid gras sintetazei*, izolat din levuri. În levuri, cele șase enzime care intră în complexul sintetazei acizilor grași sînt asociate cu proteina purtătoare de acil (ACP), în figură simbolizată prin cercul central, formînd o particulă cu masă moleculară de $2{,}3 \times 10^6$ daltoni; disocierea acestei structuri conduce la formarea de catene polipeptidice inactive. La *E. coli* sintetaza acizilor grași se întîlnește în stare disociată și fiecare component este activ catalitic, în timp ce alt complex al sintetazei, izolat din ficatul de porumbel poate, sub influența factorilor fizico-chimici, să disocieze în două componente active din punct de vedere catalitic. Această varietate de proprietăți ale complexelor nu afectează mecanismul biosintezei acizilor grași.

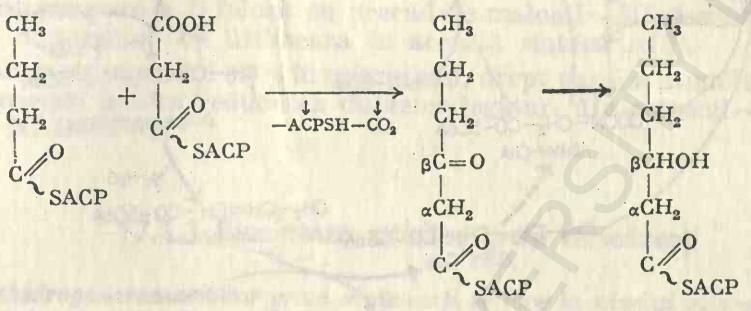
* În această ecuație globală nu apare dioxidul de carbon, deoarece el provine din malonil~SCoA în cursul reacției:

$$\text{Acetil}\sim\text{SCoA} + 7\ \text{Malonil}\sim\text{SCoA} + 14\ \text{NADPH} + 14\ \text{H}^+ \rightleftharpoons$$

$$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{COOH} + 8\ \text{CoASH} + 14\ \text{NADP}^+ + 6\ \text{H}_2\text{O} + 7\ \text{CO}_2$$

Dacă se folosesc pentru demonstrarea biosintezei acizilor grași superiori izotopi radioactivi sub formă de $^{14}CO_2$ sau $CH_3{}^{14}COOH$ etc. acizii grași rezultați în cursul biosintezei nu vor fi radioactivi deoarece C provenit din CO_2 este întotdeauna eliminat în etape de condensare a malonil~SCoA. Pentru biosinteza acidului palmitic este necesară propriu-zis o singură moleculă de acetil~SCoA care îndeplinește rolul de *primer* și poate fi regăsită în pozițiile C_{15} și C_{16}.

sînt necesare șapte asemenea cicluri și repetarea în fiecare ciclu a următorului proces : metil-malonil∼SACP se cuplează la extremitatea carboxil terminală a catenei acil în curs de sinteză cu eliberarea unui ACP—SH, pierderea grupării carboxil a malonilului și eliminarea ei sub formă de CO_2 și condensarea acil∼SACP cu malonil∼SACP cu formarea unui cetoacil∼SACP cu 2 atomi de carbon mai mult decît precedentul. Acidul rezultat este transformat de complexul multienzimatic al sintetazei acizilor grași după același mecanism : butiril∼SACP rezultat cu malonil∼SACP se condensează după reacția :



Rezultatul final al acestor reacții la numeroase organisme constă în biosinteza acidului palmitic. O reprezentare schematică globală a principalelor etape în biosinteza acizilor grași este redată în figura 17.3.

După cum se vede sursa fragmentelor de doi atomi de carbon o constituie malonil∼CoA care la rîndul său provine din acetil∼CoA. În cursul acestei sinteze la nivelul sistemului amitocondrial, pentru biosinteza unei molecule de acid palmitic este necesară o moleculă de acetil∼CoA, 14 molecule de NADPH $+H^+$ șapte molecule de malonil∼CoA și rezultă 14 molecule $NADP^+$, șapte molecule de CO_2, șapte molecule de CoA∼SH și șase molecule de apă.

Reacțiile de reducere care se întîlnesc în procesul de biosinteză a acidului palmitic necesită participarea NADPH care în ficat și în țesutul adipos al vertebratelor se formează prin oxidarea glucozo-6-fosfatului la ribulozo-5-fosfat, prin oxidarea acidului malic la acid piruvic, iar în plantele verzi prin fotoreducerea NADP la NADPH$+H^+$.

Sinteza *de novo* a acizilor grași are întotdeauna drept rezultat un acid gras superior cu un număr par de atomi de carbon, deoarece acesta provine dintr-un acetil∼SCoA ca primer și resturi de malonil∼SCoA, care prin decarboxilarea enzimatică formează unități cu 2 atomi de C. Sinteza este stopată după obținerea unei catene alcătuite din 16 C deoarece, *deacilaza*, enzimă hidrolitică care îndepărtează grupările acil de pe ACP are o activitate maximă pentru acizii grași cu catena compusă din 16 atomi de C.

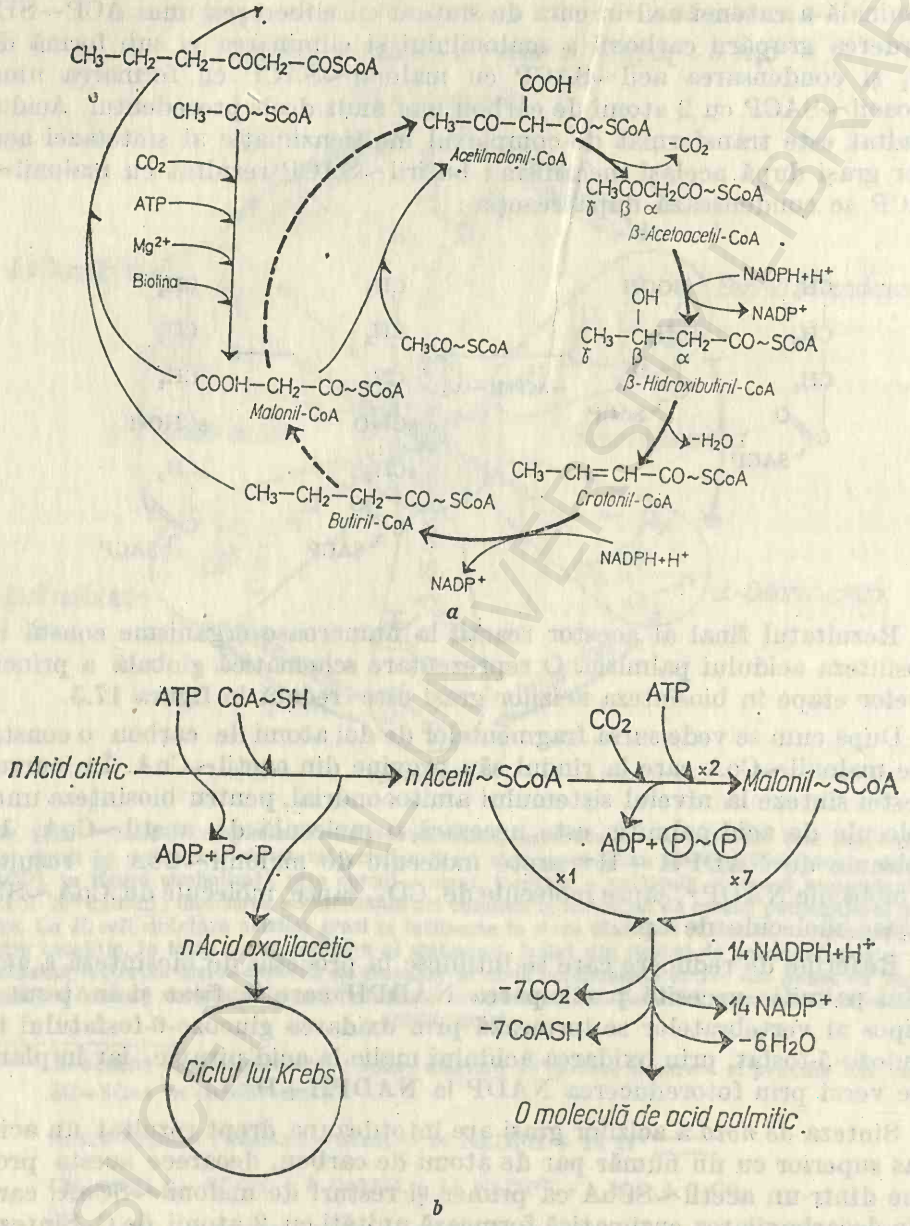


Fig. 17.3. — Schema biosintezei acizilor graşi (a) şi bilanţul global al reacţiilor în decursul cărora se sintetizează o moleculă de acid palmitic (b).

17.1.2 Sistemul mitocondrial al sintezei acizilor graşi

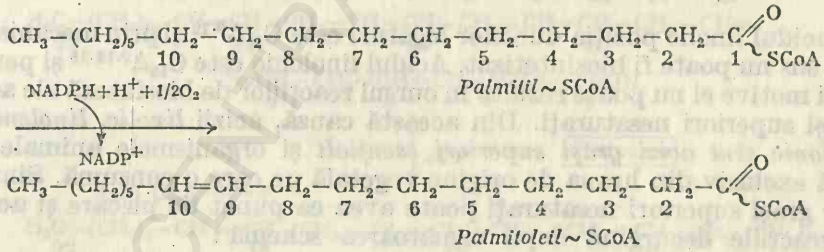
Mitocondriile sînt capabile să sintetizeze acizi graşi din lanţurile acil existente şi din acetil~SCoA prin adăugarea acestuia la extremitatea carboxil terminală. Acizii graşi saturaţi cu C_{12} şi C_{16} sintetizaţi în citoplasmă sînt utilizaţi pentru alungirea lanţului atomilor de C sub formă de acil~SCoA. Mitocondriile pot utiliza şi malonil~SCoA pentru alungirea acil~SCoA prin adăugări succesive de resturi alcătuite din doi atomi de carbon.

La nivelul microsomilor, deci pe reticulul endoplasmatic, de asemenea, poate avea loc alungirea lanţului atomilor de carbon al acizilor graşi însă în acest caz pare a fi folosit cu precădere malonil~SCoA. Sistemul enzimatic microsomal nu utilizează în această sinteză ACP.

Atît în mitocondrii cît şi în microzomi, drept sursă a atomilor de hidrogen necesari pentru reducerea dublelor legături din cetoacil~SCoA serveşte $NADPH+H^+$.

17.1.3 Biosinteza acizilor graşi nesaturaţi

Dehidrogenarea acizilor graşi sintetizaţi se face la nivelul microzomilor, în ficat şi în ţesutul adipos, în prezenţa unui sistem enzimatic care necesită oxigen şi $NADH+H^+$ şi în cazul vertebratelor superioare dubla legătură este introdusă la nivelul atomilor din poziţiile C_9, C_{10}. Natura procesului de dehidrogenare nu este complet studiată, însă oxigenul molecular cu hidrogenul transportorului de electroni şi o pereche de electroni ai substratului-(acil~SCoA) formează două molecule de apă. Ţesuturile mamiferelor poti dehidrogena acizii palmitic şi stearic cu formare de acizi graşi nesaturaţi superiori cu o dublă legătură, *acidul palmitoleic* şi *acidul oleic*. *Oxigenaza* localizată în fracţia microzomală a mamiferelor *are o acţiune specifică şi determină dehidrogenarea în poziţia 9 faţă de gruparea carboxil*:



La unele microorganisme sinteza acizilor graşi superiori nesaturaţi se realizează printr-o altă modalitate care are ca punct de plecare un β-hidroxidecanoat asupra căruia acţionează deshidratîndu-l enzima *β-hidroxidecanoiltioester dehidraza*. Produsul acestei reacţii enzimatice este $\Delta^{3,4}$-enoil~~SACP, probabil în forma *cis* şi serveşte în continuare ca substrat pentru sinteza, prin adăugare la extremitatea carboxil a resturilor de malonil ~ SCoA, a unui acid gras superior nesaturat, de exemplu, a esterului palmit-oleil ~ SACP.

În molecula acidului gras superior cu o singură dublă legătură poate fi introdusă a doua dublă legătură, rezultînd un *acid gras superior cu două duble legături în moleculă*. De la acidul palmitic sintetizat după mecanismul descris mai sus nu se pot forma acizi graşi superiori cu două duble legături situate în poziţiile corespunzătoare poziţiilor dublelor legături din acizii linolic, linolenic şi arachidonic. Acest lucru este imposibil deoarece alungirea lanţului atomilor de carbon se face la extremitatea carboxil terminală adăugîndu-se întotdeauna o unitate alcătuită din doi atomi de carbon. În felul acesta poziţia dublei legături din precursorul acil~SACP care a condensat cu malonil ~ SACP este deplasată cu două poziţii. De exemplu, din acidul palmitic prin desaturare se formează acidul palmitoleic :

Acid palmitic C_{16} :

$$\overset{10}{H_3C}-(CH_2)_5-\overset{9}{CH_2}-\overset{8}{CH_2}-\overset{7}{CH_2}-\overset{6}{CH_2}-\overset{5}{CH_2}-\overset{4}{CH_2}-\overset{3}{CH_2}-\overset{2}{CH_2}-\overset{1}{COOH}$$

$$\Big\downarrow \; 1/2\,O_2 \searrow \; \begin{matrix} NADH+H^+ \\ NAD^+ \end{matrix} \qquad \boxed{\text{Dehidrogenare}}$$

Acid palmitoleic C_{16}

$$H_3C-(CH_2)_5-\underset{10}{CH}=\underset{9}{CH}-\underset{8}{CH}-\underset{7}{CH_2}-\underset{6}{CH_2}-\underset{5}{CH_2}-\underset{4}{CH_2}-\underset{3}{CH_2}-\underset{2}{CH_2}-\underset{1}{COOH}$$

$$\Big\downarrow \; \boxed{\text{Alungirea catenei cu 2C}}$$

Acid *cis*-vaccenic $C_{18}\,\Delta^{11}$

$$H_3C-(CH_2)_5-\underset{11}{CH}=\underset{10}{CH_2}-\underset{9}{CH_2}-\underset{8}{CH_2}-\underset{7}{CH_2}-\underset{6}{CH_2}-\underset{5}{CH_2}-\underset{4}{CH_2}-\underset{3}{CH_2}-\underset{2}{CH_2}-\underset{1}{COOH}$$

$$\Big\downarrow \; 1/2O_2 \searrow \; \begin{matrix} NADPH+H^+ \\ NAD^+ \end{matrix} \qquad \boxed{\text{Dehidrogenare}}$$

Acid $C_{18}\,\Delta^{8,11}$ (nu există în natură)

$$H_3C-(CH_2)_5-\underset{12}{CH}=\underset{11}{CH}-\underset{10}{CH_2}-\underset{9}{CH}=\underset{8}{CH}-\underset{7}{CH_2}-\underset{6}{CH_2}-\underset{5}{CH_2}-\underset{4}{CH_2}-\underset{3}{CH_2}-\underset{2}{CH_2}-\underset{1}{COOH}$$

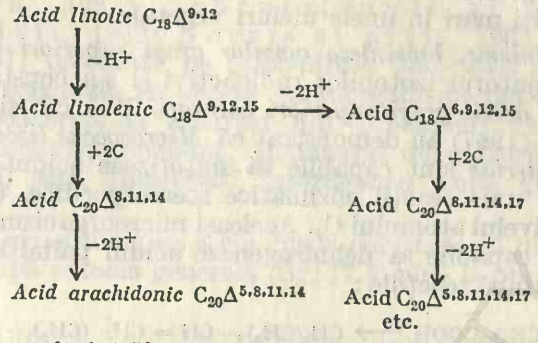
În acidul linolic poziţia dublelor legături este $C_{18}\Delta^{9,12}$ şi prin mecanismul de mai sus nu poate fi biosintetizat. Acidul linolenic este $C_{18}\Delta^{9,12,15}$ şi pentru aceleaşi motive el nu poate rezulta în cursul reacţiilor de biosinteză ale acizilor graşi superiori nesaturaţi. Din această cauză, acizii *linolic, linolenic şi arachidonic sînt acizi graşi superiori esenţiali* şi organismele animale şi-i procură exclusiv din hrana de origine vegetală pe care o consumă. Sinteza acizilor graşi superiori nesaturaţi poate avea ca punct de plecare şi acidul oleic, reacţiile decurgînd după următoarea schemă :

$$\text{Acid oleic } C_{18}\Delta^{9} \begin{cases} \nearrow \text{Acid } C_{18}\Delta^{6,9} \xrightarrow{+2C} \text{Acid } C_{20}\,\Delta^{8,11} \xrightarrow{-2H} \text{Acid } C_{20}\,\Delta^{5,8,11} \\ \searrow \text{Acid } C_{20}\Delta^{11} \xrightarrow{+2C} \text{Acid } C_{22}\Delta^{13} \xrightarrow{+2C} \text{Acid } C_{24}\Delta^{15} \end{cases}$$

(Acid nervonic)

Prin alungirea catenei atomilor de carbon şi prin reduceri succesive, acizii graşi superiori nesaturaţi se pot transforma în acizi graşi superiori cu

trei şi patru duble legături, de exemplu, acidul linolic se transformă în acid arachidonic, iar acidul linolenic în acid decozohexenoic :



Acizii graşi superiori polienici sînt utilizaţi de organismele animale pentru biosinteza prostaglandinelor şi sînt absolut necesari pentru dezvoltarea şi creşterea normală a animalelor. În lipsa lor, la şobolan, se constată apariţia dermatozelor şi îngroşarea dermei.

În ficat şi în testiculele mamiferelor s-a observat prezenţa unui sistem enzimatic capabil să hidrogeneze acizii graşi superiori nesaturaţi, determinînd astfel o transformare reciprocă a acizilor graşi. Acest proces este frecvent asociat cu o îndepărtare a unui fragment de doi atomi de carbon de la extremitatea carboxil terminală, ceea ce duce spre exemplu, la formarea acidului $C_{20}\Delta^{5,8,11,14}$ dintr-un acid $C_{22}\Delta^{4,7,10,13,16}$ ş.a.m.d. Se presupune că procesul de reducere dă naştere unui acid $C_{22}\Delta^{7,10,13,16}$, deci este redusă dubla legătură dintre C_4 — C_5 şi numai ulterior are loc procesul de îndepărtare a fragmentului alcătuit din doi atomi de carbon. Dacă procesele se mai repetă încă odată, în final rezultă un acid gras superior nesaturat esenţial — acidul arachidonic $C_{20}\Delta^{5,8,11,14}$ deoarece poziţiile atomilor de carbon la care se aflau dublele legături s-au modificat în raport cu gruparea carboxil :

Acid $C_{22}\Delta^{4,7,10,13,16}$

$$\overset{22}{H_3C}-(CH_2)_4-\overset{16}{CH}=\overset{}{CH}-CH_2-\overset{13}{CH}=\overset{}{CH}-CH_2-\overset{10}{CH}=\overset{}{CH}-CH_2-CH=$$
$$=\overset{7}{CH}-CH_2-\overset{5}{CH}=\overset{}{CH}-(CH_2)_2-\overset{1}{COOH}$$

$\downarrow +2H^+$ Reducere

Acid $C_{22}\Delta^{7,10,13,16}$

$$\overset{22}{H_3C}-(CH_2)_4-\overset{16}{CH}=\overset{}{CH}-CH_2-\overset{13}{CH}=\overset{}{CH}-CH_2-\overset{10}{CH}=\overset{}{CH}-CH_2-CH=$$
$$=\overset{7}{CH}-CH_2-\overset{5}{CH_2}-CH_2-(CH_2)_2-\overset{1}{COOH}$$

$\downarrow -2C$ Fragment 2C

Acid $C_{20}\Delta^{5,8,11,14}$

$$\overset{20}{H_3C}-(CH_2)_4-\overset{14}{CH}=\overset{}{CH}-CH_2-\overset{11}{CH}=\overset{}{CH}-CH_2-\overset{8}{CH}=\overset{}{CH}-CH_2-CH=$$
$$=\overset{5}{CH}-CH_2-CH_2-CH_2-\overset{1}{COOH}$$

La plantele superioare doi acizi graşi superiori nesaturaţi esenţiali, acizii linolic şi linolenic sînt sintetizaţi din acidul oleic în cursul unor reacţii catalizate de oxigenaze care necesită NADPH şi în condiţii aerobe. Ei se găsesc în cantităţi mari în unele uleiuri vegetale.

La microorganisme, biosinteza acizilor graşi superiori nesaturaţi a fost investigată cu ajutorul izotopilor radioactivi şi s-a constatat că *ea are ca punct de plecare acizii graşi superiori saturaţi.* Bloch şi colab. (1965, 1967) şi Fulco (1967) au demonstrat că *Micrococcus lisodeikticus* şi *Corynebacterium diphteriae* sînt capabile să sintetizeze acidul oleic din acidul stearic în cursul unei reacţii enzimatice stereospecifice, dehidrogenarea realizîndu-se la nivelul atomului C_9. Aceleaşi microorganisme posedă şi sistemele enzimatice capabile să dehidrogeneze acidul palmitic cu formare de acid palmitoleic, după reacţiile :

$$\underset{\text{Acid stearic}}{CH_3-(CH_2)_{16}COOH} \longrightarrow \underset{\text{Acid oleic}}{CH_3(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_7-COOH}$$

$$\underset{\textit{Acid palmitic}}{CH_2-(CH_2)_{14}COOH} \longrightarrow \underset{\textit{Acid palmitoleic}}{CH_3(CH_2)_5-CH=CH-(CH_2)_7COOH}$$

Microorganismele sintetizează din acizii graşi cu catena hidrocarbonată mai mică de C_{16}, de exemplu, din acizii *miristic* şi *lauric*, acid palmitic pe care ulterior îl pot dehidrogena după una din reacţiile :

$$\underset{\text{Acid palmitic}}{CH_3-(CH_2)_{14}COOH} \begin{cases} \nearrow CH_3-(CH_2)_9-CH=CH-(CH_2)_3\ COOH \\ \rightarrow CH_3-(CH_2)_6-CH=CH-(CH_2)_6\ COOH \\ \rightarrow CH_3-(CH_2)_5-CH=CH-(CH_2)_7\ COOH \\ \searrow CH_3-(CH_2)_4-CH=CH-(CH_2)_8\ COOH \end{cases}$$

Acizii palmitoleic şi oleic rezultaţi prin dehidrogenarea acidului palmitic pot fi dehidrogenaţi în continuare de unele microorganisme, de exemplu, de *Tricholoma grammapodium* :

$$CH_3-(CH_2)_7-\overset{9}{CH}=CH-(CH_2)_7-COOH$$

Acid oleic

$$CH_3-(CH_2)_4-\overset{12}{CH}=\overset{\downarrow}{CH}-CH_2-\overset{9}{CH}=CH-(CH_2)_7-COOH$$

Acid linolic

$$CH_3-(CH_2)_7-\overset{9}{CH}=CH-(CH_2)_2-\overset{6}{CH}=CH-(CH_2)_4-COOH$$

$$CH_3-(CH_2)_4-C\equiv\overset{12}{C}-CH_2-\overset{9}{CH}=CH-(CH_2)_7-COOH$$

Acid crepeninic

Alte microorganisme sînt capabile să dehidrogeneze în continuare acidul linolic rezultat din acidul oleic cu formare de acizi graşi superiori nesaturaţi de tipul acizilor eicozotrienoic $\Delta^{8,11,14}$ şi eicozotetraenoic $\Delta^{5,8,11,14}$. Din acizii graşi superiori polinesaturaţi unele microorganisme, de exemplu, *Penicillium cyaneum* pot sintetiza substanţe ciclice de tipul brefeldinului sau sînt capabile să dehidrogeneze alcanii.

17.1.3.1 Biosinteza acizilor graşi nesaturaţi pe cale anaerobă

Numeroasele cercetări ale şcolii conduse de Bloch (v. Goldfine şi Bloch, 1961; Scheuerbrandt şi alţii, 1961; Lennarz şi alţii, 1962; Norris şi alţii, 1963, 1964; Kass şi Bloch, 1967) efectuate pe *Clostridium butyricum şi Escherichia coli* au condus la concluzia că aceste microorganisme pot sintetiza acizi graşi superiori nesaturaţi şi saturaţi din precursori cu 8C şi 10C; din precursori radioactivi introduşi în mediul de cultură care conţine mai mult de 12C sînt sintetizaţi întotdeauna acizi graşi superiori saturaţi.

Analiza datelor experimentale a condus la concluzia că biosinteza acizilor graşi decurge după schema generală (fig. 17.4) pînă la obţinerea de acizi

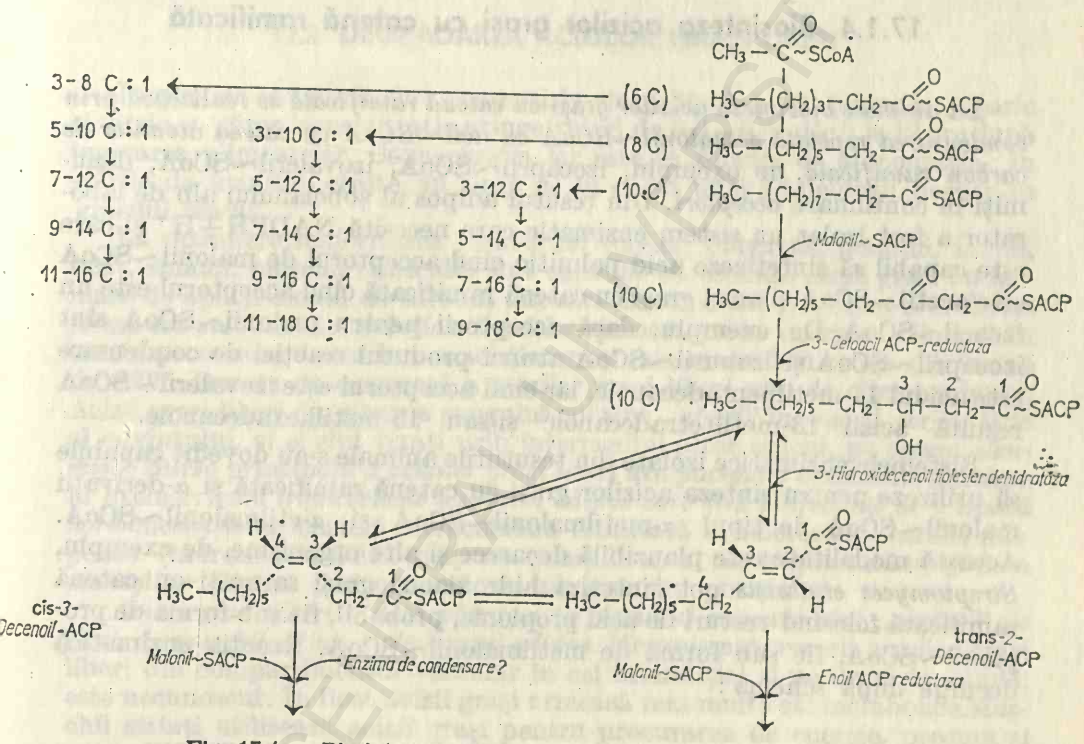


Fig. 17.4. — Biosinteza acizilor graşi nesaturaţi pe cale anaerobă.

graşi cu 6 C, 8 C şi 10 C cînd intervine o ramificare a căilor de biosinteză datorită intervenţiei unei tiolester dehidrataze care, acţionînd asupra compuşilor cu conformaţie 3-hidroxienoil~ACP, conduce la formarea *trans*-2-enoil~ACP şi *cis*-3-enoil~ACP izomerilor. Izomerul *trans*-2-enoil~ACP constituie substratul natural al enoil-ACP-reductazei şi prin condensări repetate cu malonil ~ ACP conduce la biosinteza unui acid gras superior saturat. Celălalt izomer, *cis*-3-enoil~ACP prin condensare cu malonil~ ~ACP, sub acţiunea unei enzime de condensare conduce la biosinteza unui

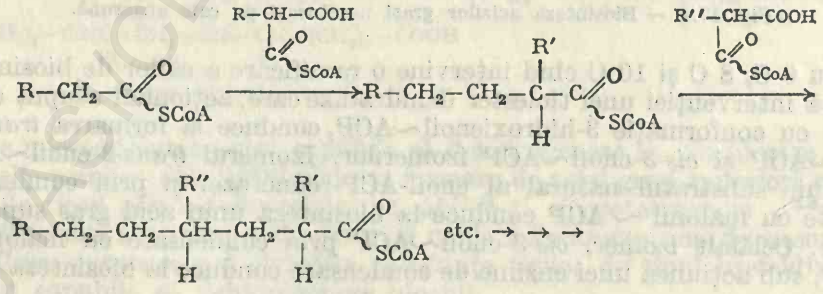
acid gras superior nesaturat, în care poziția dublei legături față de gruparea carboxil se modifică pe măsura condensării cu noile molecule de malonil~ ~ACP.

Din culturile de *E. coli*, B l o c h și c o l a b. (1962—1964) au izolat preparate de sintetaza acizilor grași care conțin o enzimă care dehidrogenează 3-hidroxidecanoil-ACP cu formare de *trans*-2-decenoat și *cis*-3-decenoat. Această enzimă este capabilă să catalizeze transformarea reciprocă a celor doi izomeri și s-a dovedit a fi capabilă să dehidrogeneze 3-hidroxitiolesterii. În funcție de precursorul de la care începe ramificarea căilor metabolice se obțin acizi grași superiori nesaturați cu structuri diferite (fig. 17.4).

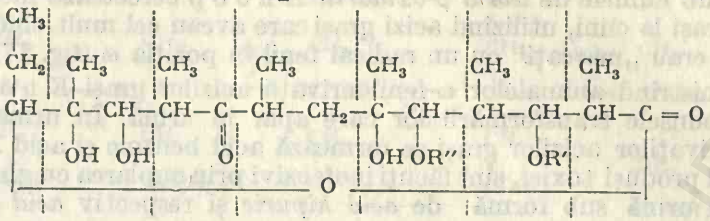
17.1.4 Biosinteza acizilor grași cu catenă ramificată

La animale biosinteza acizilor grași cu catenă ramificată se realizează prin condensarea repetată a malonil~SCoA cu acil~SCoA cu catena atomilor de carbon ramificată, de exemplu, izocapril~SCoA, izovaleril~SCoA, denumiți în continuare *acceptori*. Din țesutul adipos al șobolanului alb de laborator a fost izolat un sistem enzimatic care necesită $NADPH+H^+$ și care este capabil să sintetizeze acid palmitic cînd acceptorul de malonil~SCoA este acetil~SCoA și acizi grași cu catenă ramificată cînd acceptorul este un izoacil~SCoA. De exemplu, dacă acceptorii pentru malonil~SCoA sînt izocapril~SCoA și izobutil~SCoA atunci produsul reacției de condensare este acidul 14-metilpentadecanoic, iar cînd acceptorul este izovaleril~SCoA rezultă acizii 13-metiltetradecanoic și/sau 15-metilhexadecanoic.

Sistemele enzimatice izolate din țesuturile animale s-au dovedit capabile să utilizeze pentru sinteza acizilor grași cu catenă ramificată și α-derivații malonil~SCoA de tipul α-metilmalonil~SCoA și α-etilmalonil~SCoA. Această modalitate este plauzibilă deoarece și alte organisme, de exemplu, *Streptomyces erythreus* pot sintetiza hidroxiacizi grași saturați cu catenă ramificată folosind resturi de acid propionic, probabil, fie sub formă de propionil~SCoA, fie sub formă de metilmalonil~SCoA. Reacția enzimatică decurge după schema :



și produsul final este agliconul *eritromicinei*, denumit *eritronolid*, cu următoarea structură (resturile provenite din molecula de acid propionic sînt separate prin linii întrerupte):



În prezent nu se cunoaște nimic precis cu privire la căile și mecanismele biosintezei acizilor grași cu catenă ramificată la plante.

17.2 DEGRADAREA ACIZILOR GRAȘI LIBERI

În plasma sanguină sînt prezenți în stare liberă acizii palmitic, stearic și oleic, a căror concentrație atinge valori de 0,3—0,6 μEq/l la 12 ore după ingerarea alimentelor. Concentrația lor este în funcție de alimentație: în stările de inaniție, crește, în timp ce în cazul unei alimentații bogate în grăsimi, scade.

La mamifere majoritatea țesuturilor (creier, pancreas, plămîni, inimă, ficat, rinichi, mușchi, testicule) sînt capabile să oxideze acizii grași cu formare de apă și dioxid de carbon, din care cauză *acizii grași sînt considerați forma cea mai activă metabolic a lipidelor*; jumătate din energia eliberată în cursul proceselor de oxidare a acizilor grași este stocată în celule sub formă de ATP. Durata de existență a acizilor grași liberi este de cîteva minute. Acizii grași liberi din plasma sanguină nu sînt „liberi" în sensul strict, fizic al cuvîntului, ci ei sînt fixați prin intermediul altor anioni, pe *serum-albumine. Sursa principală a acizilor grași liberi din plasmă* o constituie aproape în exclusivitate *trigliceridele țesutului adipos care sînt hidrolizate de o lipază hormonosensibilă*, enzimă intracelulară localizată în microsomii celulei adipoase (hidrolizează acizii grași din pozițiile α, α' ale trigliceralilor) și de o *monogliceridlipază* (hidrolizează acidul gras din poziția β).

Acizii grași liberi o dată pătrunși în circuitul sanguin sînt „captați" de ficat, de mușchii striați și de țesutul adipos. Mecanismul trecerii acizilor grași liberi din compartimentul vascular în cel interstițial și pe urmă în celulă, este necunoscut. În ficat acizii grași urmează mai multe căi metabolice. Mușchii striați utilizează acizii grași pentru procurarea de energie, precum și pentru sinteza de trigliceride. *În țesutul adipos acizii grași sînt stocați sub formă de triacilgliceroli și într-o măsură mult mai mică sînt degradați prin oxidare.*

17.2.1 Degradarea acizilor grași prin mecanismul β-oxidării

În prezent, se cunoaște că acizii *grași sînt oxidați în întregime cu formare de CO_2 și apă și că sediul unic al acestor transformări sînt mitocondriile*, în care sînt localizate sistemele enzimatice necesare acestui proces metabolic.

Prima teorie cu privire la mecanismul degradării acizilor graşi a fost emisă la începutul secolului al XX-lea de către K n o o p (1904) şi este cunoscută sub numele de *teoria β-oxidării*. K n o o p cercetează metabolismul acizilor graşi la cîini, utilizînd acizi graşi care aveau cel mult cinci atomi de carbon şi erau „marcaţi" cu un radical fenil în poziţia ω (fig. 17.4).

Administrînd animalelor ω-fenilderivaţii acizilor graşi K n o o p cercetează produsele transformării lor care apar în urină. În urma oxidării ω-fenilderivaţilor acizilor graşi se formează acid benzoic şi acid fenilacetic, care, fiind produşi toxici, sînt făcuţi inofensivi prin cuplarea cu glicocol şi eliminaţi în urină sub formă de *acid hipuric* şi respectiv *acid fenacetinic* (fig. 17.5).

K n o o p constată că acizii ω-fenilbutiric şi ω-fenilacetic nu provoacă o eliminare crescută pe cale urinară a acidului hipuric, a cărui concentraţie în urină creşte însă în cazul folosirii acizilor ω-fenilvalerianic şi ω-fenilpropionic. Pe baza acestor rezultate K n o o p ajunge la concluzia că, *lanţul*

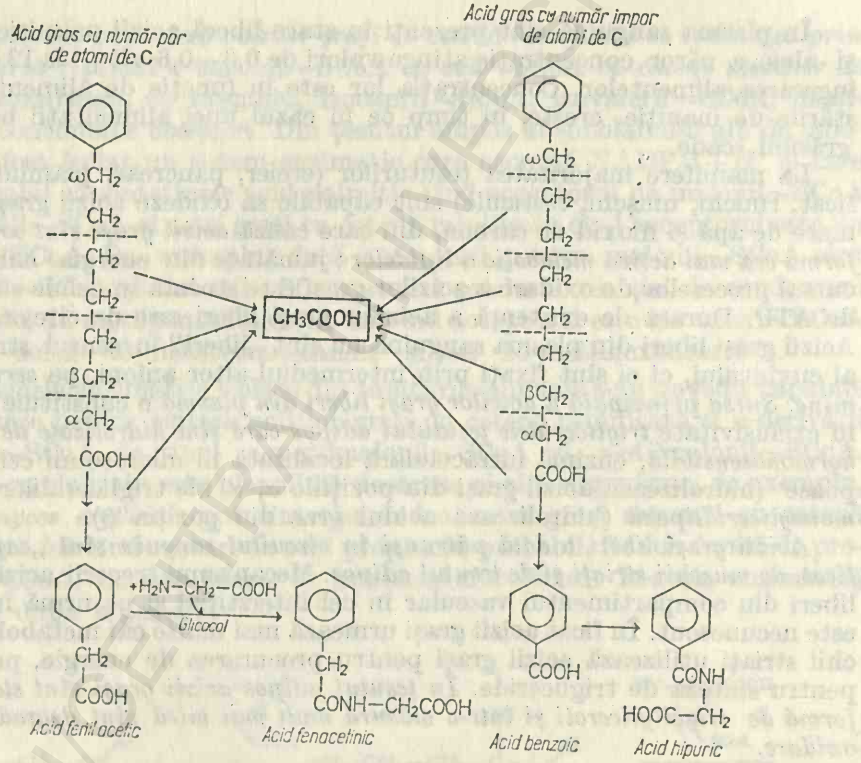
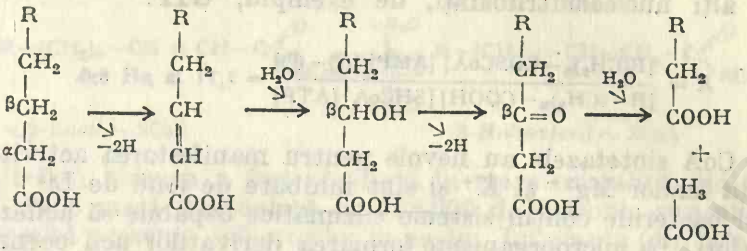


Fig. 17.5. — Degradarea acizilor graşi cu număr par şi impar de atomi de carbon după mecanismul β-oxidării, cu formare de acid acetic, din ω-derivaţii acizilor graşi.

atomilor de carbon ai acidului gras transformat are de fiecare dată cu doi atomi de carbon mai puţin şi prin urmare, procesul de oxidare are loc la gruparea $-CH_2-$ care se găseşte întotdeauna în poziţia β faţă de carboxil. Reprezen-

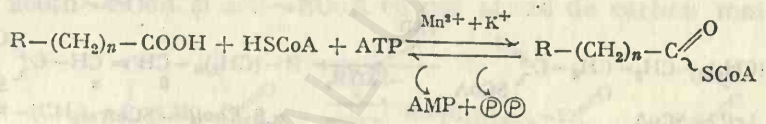
tarea schematică a mecanismului degradării acizilor graşi după Knoop poate fi redată schematic astfel :



În felul acesta din acidul stearic (18 C) se formează acidul palmitic (16 C), apoi acidul miristic (14 C) etc. pînă la completa oxidare cu formare de apă şi bioxid de carbon.

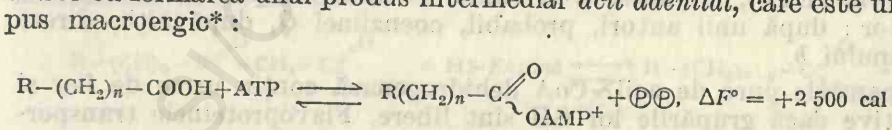
Knoop a identificat ca produşi intermediari ai procesului de degradare a acizilor graşi prin mecanismul β-oxidării β-oxi-, β-ceto-şi α, β-derivaţi nesaturaţi. *Elucidarea etapelor intermediare ale oxidării acizilor graşi* a devenit posibilă după anul 1943 graţie lucrărilor lui Leloir, Kennedy, Lehninger, Barker, Green, Lynen şi colaboratorilor lor care *au stabilit enzimele participante la acest proces şi rolul coenzimei A în metabolismul acizilor graşi.* S-a demonstrat că toţi produşii intermediari ai β-oxidării acizilor graşi sînt derivaţi ai CoASH şi rolul acestei coenzime în metabolismul acizilor graşi poate fi comparat cu rolul îndeplinit de fosfat în metabolismul glucidelor.

Reacţii de activare a acizilor graşi. Etapa iniţială în oxidarea acizilor graşi constă în activarea lor prin formarea de acil derivaţi ai CoASH. Activarea decurge conform reacţiei :



care este catalizată de *acil CoA sintetaze.* Din categoria acil~CoA sintetazelor au fost identificate în ţesuturile animale mai multe enzime, denumite în funcţie de lungimea catenei atomilor de carbon : *acetil CoA sintetaza,* care activează acizii graşi cu C_2 şi C_3, *octanoil CoA sintetaza,* care activează acizii graşi cu C_4 pînă la C_{12} şi *dodecanoil CoA sintetaza* care activează acizii graşi care conţin C_{10} pînă la C_{18}. Acil~CoA sintetazele sînt localizate în membrana mitocondrială externă şi în reticulul endoplasmatic.

Reacţia de activare a acizilor graşi decurge de fapt în două etape distincte cu formarea unui produs intermediar *acil adenilat,* care este un compus macroergic* :

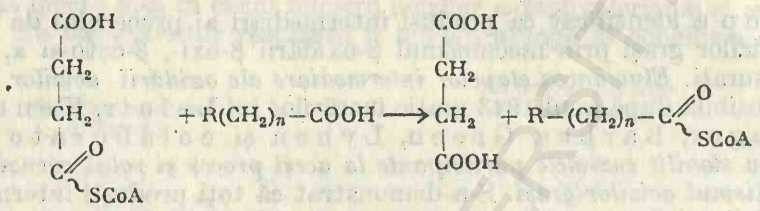


* Formulele structurale ale acil adenilaţilor sînt menţionate în capitolul 19.

În reacţiile de activare a acizilor graşi în cazul acil~CoA sintetazei izolate din mitocondriile ficatului de bovine pot funcţiona ca sursă macroergică şi alţi nucleozidtrifosfaţi, de exemplu, GTP.

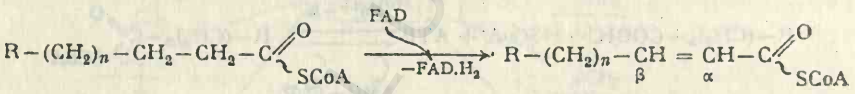
$$K = \frac{[R(CH_2)_n - COSCoA]\,[AMP]\,[Ⓟ - Ⓟ]}{[R-(CH_2)_n-COOH]\,[SHCoA]\,[ATP]} = 1{,}11 \text{ la } pH\ 8{,}0.$$

Acil ~ CoA sintetazele au nevoie pentru manifestarea activităţii lor de prezenţa ionilor Mg^{2+} şi K^+ şi sînt inhibate de ionii de Li^{2+} şi Na^+. Plantele şi bacteriile conţin sisteme enzimatice capabile să acileze acizii graşi inferiori. La microorganisme formarea derivaţilor acil coenzimei A este catalizată în principal de *tioforaze*, care se întîlnesc şi în unele ţesuturi animale (altele decît ţesutul hepatic) şi catalizează reacţii de tipul :



Succinil ~ SCoA *Acid gras* *Acid succinic* *Acil ~ SCoA*

Derivatul acil ~ SCoA astfel format este dehidrogenat enzimatic în prezenţa acil CoA dehidrogenazelor, care conţin în calitate de coenzină FAD, cu formarea unui derivat nesaturat în poziţiile α, β după reacţia :



Acil ~ SCoA *α,β-Enoil ~ SCoA*

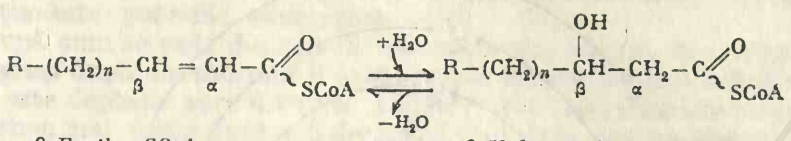
În ţesuturile animale, în particular în ficatul de porumbel, au fost identificate trei *acil CoA dehidrogenaze* diferite : butiril —, octanoil — şi hexadecanoil — CoA dehidrogenazele cu specificităţi de substrat deosebite.

Electronii captaţi în cursul reacţiei de Acil ~ CoA dehidrogenaze nu pot fi cedaţi direct componentelor *lanţului respirator* sau oxigenului din care cauză flavinenzima îi cedează unei alte *flavoproteine transportoare de electroni* (ETF), iar aceasta la rîndul ei unui component al lanţului respirator : după unii autori, probabil, coenzimei *Q*, după alţii, direct citocromului *b*.

Preparatele pure de acil~CoA dehidrogenază conţin urme de fier şi sînt active dacă grupările lor SH sînt libere. Flavoproteinele transportoare de electroni conţin 1 mol FAD/1 mol de enzimă, nu au în structura lor ioni metalici şi în absenţa lor acil dehidrogenazele sînt nefuncţionabile.

α, β-Enoil ~ SCoA sau $\Delta^{2,3}$-trans-enoil ~ SCoA este în continuare transformat sub acţiunea Enoil-CoA hidrazei (Enoil *CoA hidrataza* sau

crotonaza, denumirea sistematică : 3 hidroxiacil CoA hidrolază) într-un *β-hidroxiacil ~ SCoA*, în cursul reacției :



α,β-*Enoil* ~ SCoA — β-*Hidroxiacil* ~ SCoA

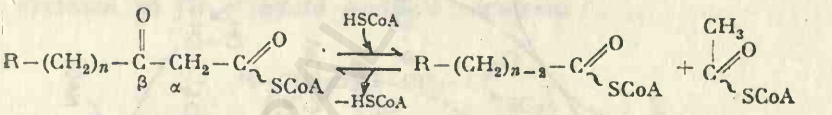
Enoil CoA hidraza a fost obținută în stare cristalină din ficatul de bovine, are o masă moleculară de 168 000 de daltoni, este un hexamer și nu necesită prezența cofactorilor în mediu. La plante (din cele studiate) a fost identificată în spanac. Această enzimă acționează asupra acizilor grași cu C_4 pînă la C_{12} și catalizează stereospecific adiția apei la nivelul dublei legături.

β-Hidroxiacil CoA este dehidrogenat de către β-hidroxiacil~SCoA dehidrogenază, cu formare de β-ceto acil~SCoA.

β-*Cetoacil*~SCoA

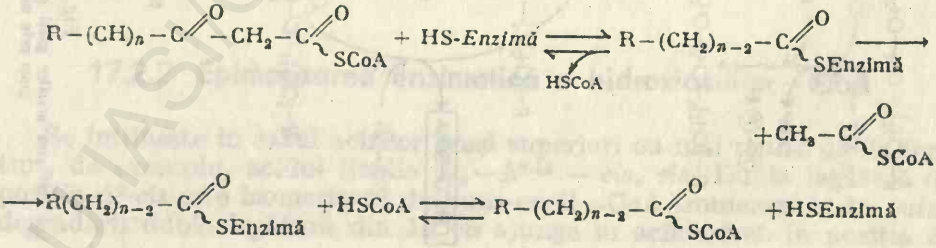
β-Hidroxiacil~CoA dehidrogenaza a fost izolată în stare cristalină din inima de porc și necesită NAD^+ ; ea acționează asupra acizilor grași cu C_4 pînă la C_{12} și este specifică față de *L*(+) izomerii β-Oxiacil~SCoA. Aceasta este a doua dehidrogenare a moleculei acidului gras inițial.

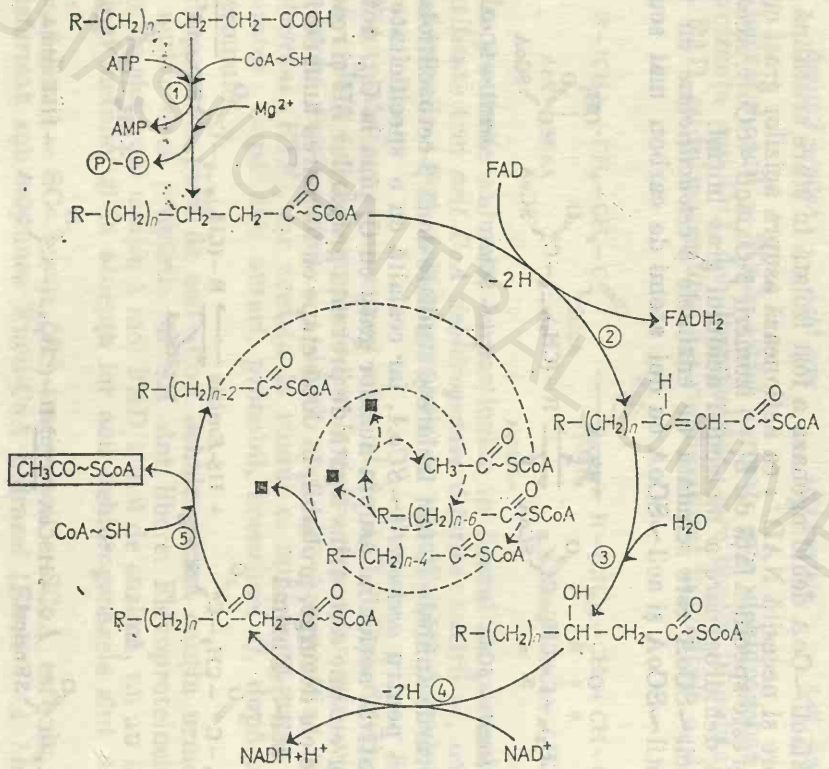
β--Cetoacil~SCoA este scindată de enzimele *β-cetoaciltiolaze* cu formare de acetil~SCoA și acil~SCoA cu doi atomi de carbon mai scurt :



β-*Cetoacil* ~ SCoA — *Acil* ~ SCoA — *Acetil* ~ SCoA

Din țesuturile animale au fost izolate și studiate două β-cetoaciltiolaze : una specifică pentru *acetoacetil~SCoA*, iar cealaltă cu o specificitate de substrat relativă, acționînd asupra acizilor grași cu C_4 pînă la C_{16}. Activitatea acestor enzime este strîns legată de prezența grupărilor SH și reacția catalizată de ele decurge, probabil, în două etape cu formarea unui derivat intermediar acil-S-Enzimă :





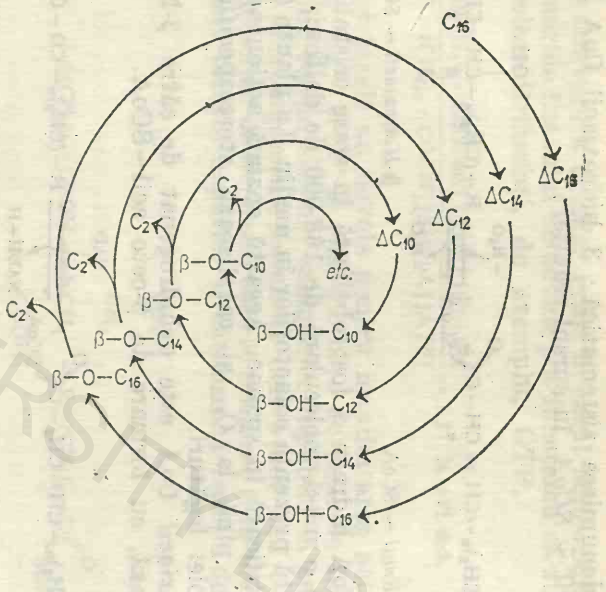


Fig. 17.6. A. — Degradarea β-oxidativă a acizilor graşi saturaţi cu formare de acetil~SCoA (■).

a — Activarea acizilor graşi şi fazele succesive de degradare cu indicarea reacţiilor la care participă FAD, NAD+ şi CoA~SH; *b* — Schema de principiu a degradării acizilor graşi prin mecanismul β-oxidării cu menţionarea principalelor etape: dehidrogenarea, formarea derivaţilor β-hidroxi- şi β-ceto şi a acetil~SCoA.

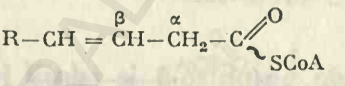
BCU "CAROL I" CENTRALĂ UNIVERSITARĂ LIBRARY

Din această cauză această reacție de scindare a fost denumită *reacție de tioliză sau scindare tiolitică*, deoarece seamănă cu reacțiile de hidroliză. Reacția este puternic exergonică.

După cum se vede din cele de mai sus toate reacțiile de oxidare a acizilor grași după mecanismul β-oxidării sînt reversibile însă echilibrul reacțiilor este deplasat spre dreapta. Acilderivatul CoA, care are cu doi atomi de carbon mai puțin decît acil derivatul CoA de la care s-a plecat, intră din nou în ciclul de reacții descris mai sus pînă cînd dintr-un acid gras cu un număr par de atomi de carbon ($n = 18, 16, 14$ etc.) rezultă $n/2$ molecule de acetil~SCoA. Degradarea acidului gras se realizează astfel după o spirală (fig. 17.6 A) pînă la acetil~SCoA, produsul final al degradării acizilor grași cu număr par de atomi de carbon.

Procesul degradării acizilor grași superiori prin β-oxidare comportă și unele probleme speciale. Una dintre acestea este *problema stereoizomerilor*. În reacția catalizată de acil~CoA dehidrogenază se formează acilderivați α,β-nesaturați cu configurație *trans*. Izomerii care participă în reacțiile următoare sînt puțin cunoscuți. W a k i l și G a n g u l y (1959) consideră că în cursul reacției de hidratare *cis*-izomerii se hidratează cu formare de *D*-izomeri, iar *trans*-izomerii cu formare de *L*-izomeri. În experiențe în care s-a folosit enoil hidrază cristalină s-a constatat că enzima transformă *cis*-izomerul în *trans*-izomer și în cursul hidratării rezultă *L*(+) β-oxiacil~ ~SCoA. Izomerul *D*(−) rezultă după acțiunea enoil hidrazei asupra *L*-izomerului. Aceiași enzimă este capabilă să catalizeze și reacții de izomerie de poziție, transformînd derivații acil~CoA β,γ-nesaturați în derivați acil~CoA α,β-nesaturați. Această ultimă acțiune a enoil hidrazei reamintește de acțiunea *enoil CoA izomerazei*.

Acizii grași superiori nesaturați cu număr par de atomi de C sînt degradați după mecanismul β-oxidării pînă în faza cînd dubla legătură din structura lor este situată între doi atomi de carbon vecini atomului de C la nivelul căruia urmează să fie scindată legătura covalentă :



Dubla legătură în acizii grași superiori naturali are însă o configurație *cis* și după acțiunea enoil hidrazei se obține un Δ^3-*cis-enoil~SCoA*. În procesul β-oxidării poziția dublei legături este întotdeauna Δ^2-*trans*-Enoil~ ~SCoA. Din această cauză Δ^3-*cis*-enoil~SCoA este izomerizat de către Δ^3-*cis*-Δ^2*trans-noil~CoA izomerază* cu formarea izomerului Δ^3-*trans*-Enoil~ ~SCoA care este degradat prin β-oxidare. Pentru exemplificare redăm reacțiile de oxidare a acidului oleic și acidului linoleic (fig. 17. 6 B).

17.2.2 Epimerizarea enzimatică a hidroxiacililor ~ CoA

Se întîlnește în cazul acizilor grași superiori cu mai multe duble legături, de exemplu, acidul linolic C_{18}—$\Delta^{9,12}$ — *cis, cis*. Dubla legătură din poziția Δ^9-*cis* este izomerizată de *trans*-enoil~CoA izomerază și în cursul degradării dubla legătură din 12 cis-ajunge în acilderivat în poziția Δ^2,

dar are o configurație *cis* iar β-hidroxiacil~CoA dehidrogenaza poate dehidrogena numai izomerii *L*. Din Δ^2-*cis*-acilderivat se formează însă un *D*-izomer. Degradarea acidului gras continuă datorită β-*hidroxiacil CoA epimerazei* care transformă izomerii *D* în izomeri *L*.

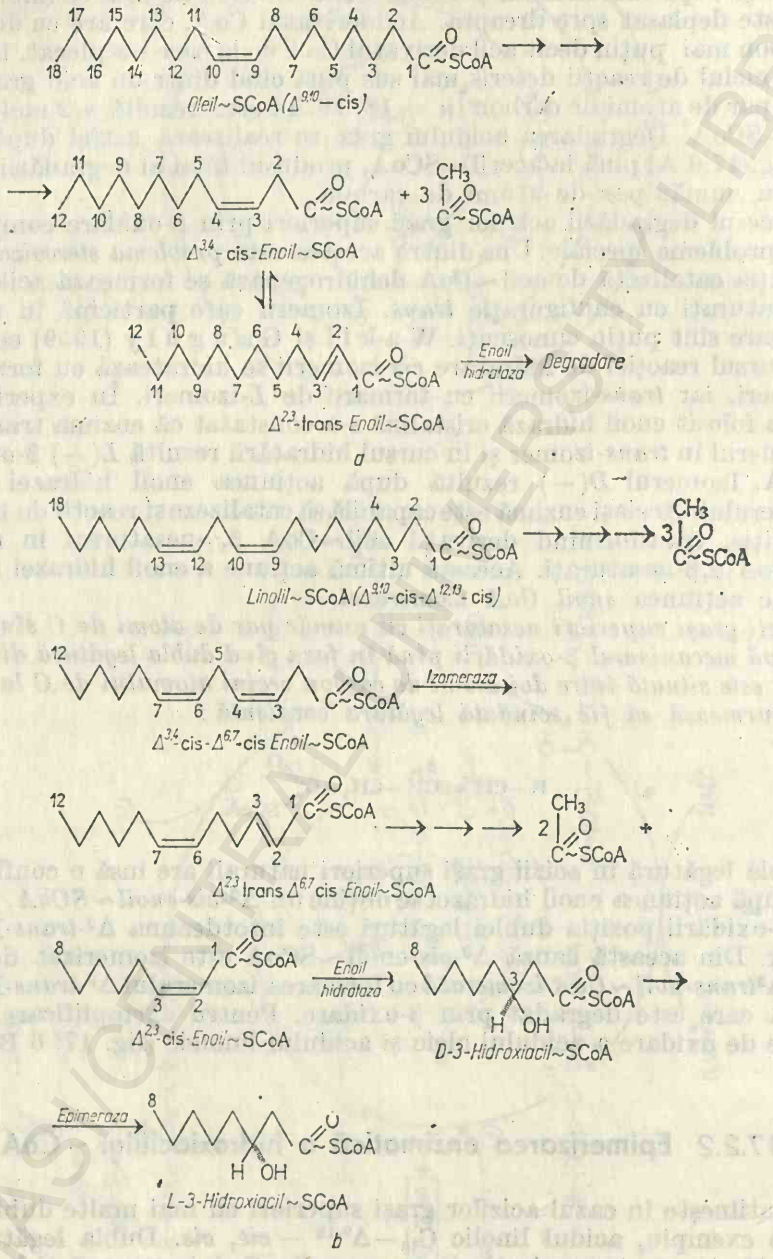
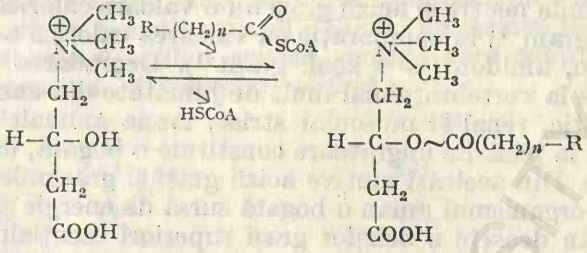


Fig. 17.6. B. Mecanismul β-oxidării acizilor graşi nesaturaţi :
a — degradarea acidului oleic şi *b* — degradarea acidului linoleic.

BCU CLUJ-NAPOCA UNIVERSITY LIBRARY

Formarea și rolul acilcarnitinei. Biosinteza acilderivaților CoA are loc în membrana celulară, la nivelul reticulului endoplasmatic și al membranei mitocondriale externe. Sediul degradării acizilor grași este mitocondria care posedă echipamentul enzimatic necesar acestui proces. Din această cauză acil∼SCoA trebuie să pătrundă în interiorul mitocondriei, dar membranele mitocondriale sînt impermeabile pentru ei. Transportul acil∼SCoA se realizează sub formă de *acilcarnitină* care ia naștere în urma unei reacții de transfer:



L-Carnitină *Acilcarnitină*

Acilcarnitina pătrunde în mitocondrie și reacția de mai sus decurge în sens invers, adică de la dreapta la stînga, fiind reversibilă; se formează din nou acil∼SCoA care este supus β-oxidării. *L-Carnitinacil transferaza*, care catalizează această reacție este o enzimă asociată cu membrana mitocondrială internă și poate fi privită ca o *transferază* (transferă acilul de la CoA la carnitină) și ca o *translocază* (transferă acilul din exteriorul mitocondriei în interiorul acesteia). În prezent se cunosc două enzime diferite: *o acetil CoA-carnitinacetil transferază* care catalizează acilarea carnitinei cu acizii grași inferiori și o palmitil-CoA carnitin transferază care mediază acilarea carnitinei cu acizii grași superiori cu catenă lungă.

17.2.3 Ciclul Krebs și β-oxidarea acizilor grași

Mitocondriile sînt formațiuni infracelulare care posedă echipamentele enzimatice necesare β-oxidării acizilor grași și ciclului lui Krebs. Acetil∼SCoA care se formează în cursul degradării oxidative a acizilor grași este în continuare metabolizat în ciclul Krebs pînă la formare de dioxid de carbon și apă. Bilanțul final al oxidării complete a unui mol de acid palmitic poate fi redat sumar prin ecuația:

$$CH_3-(CH_2)_{14}-COOH+23\ O_2+30\ H_2O \longrightarrow 16\ CO_2+46\ H_2O;\ \Delta G^\circ = -2\,330{,}5\ \text{cal.}$$

din care se vede că rezultă o mare cantitate de energie. Această energie rezultă prin oxidarea unei molecule de $NADH+H^+$ și a unei molecule de $FADH_2$ în lanțul respirator (cap. 16). Oxidarea unui mol de $NADH+H^+$ este însoțită de sinteza a 3 moli de ATP, iar oxidarea unui mol de $FADH_2$ — de 2 mol de ATP. Prin urmare pentru fiecare mol de acetil∼SCoA se

formează 5 moli de ATP. În cursul oxidării acidului palmitic acest proces se repetă de şapte ori şi în consecinţă se vor forma 35 moli de ATP, din care un mol de ATP a fost consumat în etapa iniţială a β-oxidării. Bilanţul parţial este deci de 34 moli de ATP. Cei 8 moli de acetil~SCoA rezultaţi prin degradarea acidului palmitic sînt oxidaţi în ciclul Krebs şi formează $8 \times 12 = 96$ moli de ATP. Bilanţul final este deci de 130 moli de ATP, iar randamentul procesului de $1\,308/2\,330 = 56\%$ (dacă se consideră că $\Delta G°$ prin hidroliza ATP este egal cu 8 kcal; 2 330 reprezintă kcal rezultate prin arderea în bomba calorimetrică a unui gram-mol de acid palmitic). Grăsimile neutre şi acizii graşi au o valoare calorică mare (aproximativ 9 kcal. $gram^{-1}$) în comparaţie cu valoarea calorică a glucidelor — glucoză, glicogen, amidon (~ 4 kcal. $gram^{-1}$). Degradarea acizilor graşi pune în libertate la vertebrate mai mult de jumătate din energia necesară ţesuturilor hepatic, renal şi muscular striat, iar la animalele care hibernează precum şi la păsările migratoare constituie o bogată, dacă nu unică, sursă de energie. Din aceleaşi motive acizii graşi şi grăsimile neutre constituie şi pentru organismul uman o bogată sursă de energie şi prezenţa lor în alimentaţie, în deosebi a acizilor graşi superiori esenţiali, este obligatorie. *Dintre toate ţesuturile numai sistemul nervos central foloseşte energie rezultată prin degradarea glucozei, fiind total dependent de acest proces.*

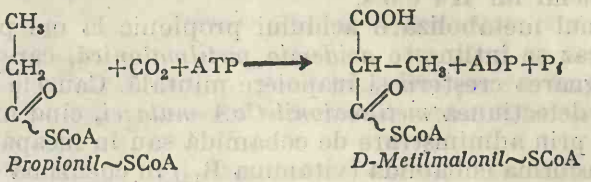
De reţinut faptul că acetil~SCoA care se formează prin degradarea acizilor graşi nu este folosită numai în ciclul lui Krebs, pentru obţinerea energiei necesare numeroaselor procese biochimice, ci el poate fi utilizat pentru biosinteza numeroaselor substanţe ca acizii graşi, sterolii, compuşii izoprenici şi izoprenoidici, terpene, cauciuc, hormoni steroizi, carotenoizi, lipide complexe ş.a.).

β-oxidarea acizilor graşi la plante a fost cercetată de Grace (1939), Synerholm şi Zimmerman (1947) Fawcet şi alţii (1958) utilizînd în principiu metoda lui Knoop (1904) uşor modificată. Derivaţii acizilor ω-fenoxialchilcarbonici cu număr par şi impar de atomi de C sînt introduşi în plantă şi prin degradarea lor dau compuşi finali cu sau fără activitate biologică (v. fig. 17.7). Experienţele efectuate pe plante, în special pe grîu, mazăre, tomate ş.a. au confirmat existenţa în ţesuturile vegetale a enzimelor necesare procesului de degradare a acizilor graşi şi faptul că această degradare are loc prin mecanismul β-oxidării. Sistemele enzimatice izolate din plante necesită pentru oxidarea acizilor graşi ATP, HSCoA, NAD^+, $NADP^+$, Mn^{2+}, glutation şi acizii ciclului Krebs. Aceste sisteme enzimatice sînt studiate cu viu interes.

Degradarea acizilor graşi superiori cu număr impar de atomi de carbon prin β-oxidare are loc cu scindarea succesivă a acetil~SCoA, dar produsul care se formează în ultima fază de degradare (fragmentul ω-terminal) este *propionil~SCoA*, şi nu acetil~SCoA. Acidul propionic nu se întîlneşte în stare liberă în celulele vegetale şi animale, deşi el se formează şi în cursul metabolizării aminoacizilor alifatici cu catenă ramificată *(valina* şi *izoleucina*, v. cap. 19). De la această regulă generală fac excepţie numai animalele rumegătoare în stomacul cărora este prezent acidul propionic ca rezultat al fermentaţiilor microbiene.

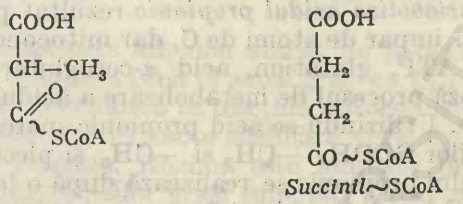
În mitocondriile celulelor animale acidul propionic este oxidat de o manieră specială : în prezenţa *propionil CoA carboxilazei*, enzimă care con-

ţine biotină şi necesită prezenţa ionilor de Mg^{2+}, acidul propionic este carboxilat cu formare de metilmalonil~SCoA, după reacţia :



Propionil~SCoA *D-Metilmalonil~SCoA*

D-Metilmalonil~SCoA sub acţiunea *metilmalonil~SCoA racemazei* este transformat în *L*-metil-malonil~SCoA, iar acesta la rîndul lui este trecut de *metilmalonil~SCoA mutază*, enzimă care conţine cobamidă în calitate de coenzimă, în *succinil~SCoA* :



Succinil~SCoA

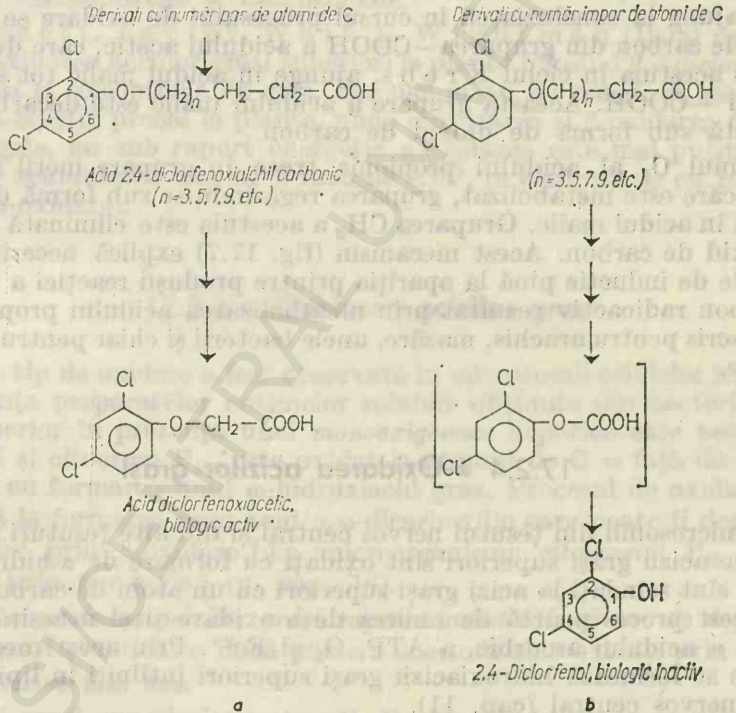


Fig. 17.7. — Utilizarea acizilor ω (2,4-diclorfenoxi)-alchilcarbonici pentru demonstrarea mecanismului β-oxidării la plante (a). Principiul metodei constă în aceea că acizii ω (2,4-diclorfenoxi)-alchilcarbonici sînt degradaţi cu formarea unor produşi care posedă sau sînt lipsiţi de activitate biologică. *b*. — Degradarea acidului propionic la plante după o variantă modificată a β-oxidării acizilor graşi. Cu × şi □ sînt indicaţi atomii de carbon ai grupărilor —COOH şi respectiv —CH_3.

Succinil~SCoA rezultat prin metabolizarea propionil~SCoA este utilizat în ciclul lui Krebs.

Mecanismul metabolizării acidului propionic la om poate fi dereglat și în acest caz se întîlnește *acidemia metilmalonică*, care este însoțită la copii de stagnarea creșterii și înapoiere mintală. Cauzele ei pot consta în absența sau defecțiunea *metilmalonil-CoA mutazei*, cînd maladia nu poate fi vindecată prin administrare de cobamidă sau în incapacitatea țesuturilor de a transforma cobamida (vitamina B_{12}) în coenzimă (în cazurile cînd introducerea de vitamină B_{12} suprimă acidemia și aciduria malonică). Acidemia malonică este o *boală ereditară* și vizează în principal ficatul.

Aciduria propionică și *acidemia propionică* sînt, de asemenea, boli ereditare cauzate de defecțiuni ale propionil CoA carboxilazei.

Plantele pot metaboliza acidul propionic rezultat prin degradarea acizilor grași cu număr impar de atomi de C, dar mitocondriile lor au nevoie de CoASH, NAD^+, ATP, glutation, acid α-cetoglutaric. Ionii de Mn^{2+} și $NADP^+$ accelerează procesul de metabolizare a acidului propionic în mitocondriile vegetale. Utilizîndu-se acid propionic marcat cu ^{14}C la atomi de carbon ai grupărilor COOH, $-CH_2$ și $-CH_3$ și plecînd de la observația că oxidarea acidului propionic se realizează după o fază de *lag* sau o perioadă de inducție, Giovanelli și Stumpf (1958), Bonner și alții (1964) ajung la concluzia că în cursul procesului de oxidare se formează dioxid de carbon din gruparea —COOH a acidului acetic, care după încorporarea acestuia în ciclul Krebs, ajunge în acidul malic tot sub forma grupării —COOH. Această grupare a acidului malic este decarboxilată și eliminată sub formă de dioxid de carbon.

Atomul C_2 al acidului propionic trece în grupare metil a acidului acetic, care este metabolizat, gruparea regăsindu-se sub formă de grupare metilen în acidul malic. Gruparea CH_3 a acestuia este eliminată sub formă de dioxid de carbon. Acest mecanism (fig. 17.7) explică necesitatea unei perioade de inducție pînă la apariția printre produșii reacției a dioxidului de carbon radioactiv rezultat prin metabolizarea acidului propionic, și a fost descris pentru arachis, mazăre, unele bacterii și chiar pentru țesuturile animale.

17.2.4 α-Oxidarea acizilor grași

În microsomii din țesutul nervos central și din alte țesuturi animale și vegetale acizii grași superiori sînt oxidați cu formare de α-hidroxiacizi și aceștia sînt scindați la acizi grași superiori cu un atom de carbon mai puțin. Acest proces poartă denumirea de α-oxidare și el necesită prezența NAD^+, a acidului ascorbic, a ATP, O_2 și Fe^{2+}. Prin acest mecanism de oxidare se formează hidroxiacizii grași superiori întîlniți în lipidele sistemului nervos central (cap. 11).

Alcoolul superior nesaturat *fitolul*, prezent în alimentația omului (grăsimi animale, lapte și produse lactate, vegetale etc.) este oxidat cu formare de *acid fitanic*, acid 3,7,11,15 tetrametilhexadecanoic, care este degradat în sistemul nervos central prin α-oxidare. În maladia lui Refsum, care se transmite ereditar, α-oxidarea acidului fitanic nu mai este

posibilă și acesta se acumulează în țesutul nervos, în ficat și în serul sanguin. În mod normal acidul fitanic este α-oxidat de *fitat α-oxidază* cu formare de acid 2,6,10,14-tetrametilpentadecanoic care în continuare este degradat β-oxidativ.

La plante α-oxidarea acizilor grași superiori are loc în cursul a două reacții enzimatice, prima catalizată de *peroxidaza acizilor grași superiori*:

$$R-(CH_2)_n-CH_2-CH_2-COOH+H_2O_2 \longrightarrow R-(CH_2)_n-CH_2-CHO+CO_2+H_2O$$

iar a doua — de *dehidrogenaza aldehidelor acizilor grași superiori*:

$$R-(CH_2)_n-CH_2-CHO+H_2O+NAD^+ \longrightarrow R-(CH_2)_n-CH_2COOH+NADH^++H^+$$

Acidul gras rezultat este din nou atacat de peroxidaza acizilor grași superiori și reacțiile se repetă pînă la acizii grași cu C_{14}. Peroxidaza acizilor grași superiori a fost identificată în fracțiile mitocondrială, microsomală și în supernatantul diferitelor extracte acelulare vegetale, dar nu a putut fi găsită în țesuturile animale. Enzima este inhibată de *azidă, imidazol* și *cianură*. Dehidrogenaza acizilor grași superiori a fost remarcată numai în fracțiile mitocondriale și microsomale.

Fawcett, Taylor, Wain și Wightman (1958) au demonstrat α-oxidarea acizilor grași superiori la plante folosind *2,4-diclorfenoxialchilnitrilii* și coleoptilele de grîu, dar nici ei nu au reușit să sesizeze importanța acestui proces la plante, unde α-oxidarea și β-oxidarea decurg cu viteze egale, iar sub raport energetic α-oxidarea este mai puțin avantajoasă (se acumulează numai 6 moli de ATP, în comparație cu 16 moli de ATP în β-oxidare).

17.2.5 ω-Oxidarea acizilor grași

Acest tip de oxidare a fost observată în microsomii celulelor hepatice și în prezența preparatelor enzimelor solubile obținute din bacterii. Acidul gras superior în prezența unei *monooxigenaze* hepatice care necesită O_2, NADPH și citocrom P_{450} este oxidat la atomul de C ω față de gruparea carboxil cu formarea unui ω-hidroxiacid gras. Procesul de oxidare continuă pînă la formarea unui acid α,ω-dicarboxilic care poate fi degradat în continuare prin β-oxidare. La microorganisme *citocromul* P_{450} poate fi înlocuit prin *ferodoxină* (v. cap. 16).

α- și ω-oxidarea acizilor grași superiori sînt căi minore de degradare a acizilor grași și numai o mică parte a acestora sînt oxidați prin mecanismele descrise mai sus.

Acizii grași superiori nesaturați, *linolic, linolenic* și *arachidonic*, sînt oxidați la plante de *lipoxidază* (lipoxigenază) dar semnificația fiziologică a acestui proces rămîne necunoscută. Se cunoaște însă că în prezența acidului linolic lipoxidaza poate cataliza *oxidarea carotenilor, clorofilei, heminei* și *acidului ascorbic*.

17.2.6 Geneza acetoacetatului, cetoza și echilibrul acido-bazic

Conform teoriei β-oxidării formulată de K n o o p un acid gras este degradat treptat pînă în stadiul unui derivat care conține 4 atomi de carbon și care poate forma două unități C_2 sub forma de acid acetic activat. Derivatul cu patru atomi de carbon conduce și la acid butiric care este supus β-oxidării și se poate forma o singură moleculă de acetilacetat. Totuși această teorie nu poate explica prezența în cantități relativ însemnate (1,5—2,0 mg/100 ml în 24 ore) de corpi cetonici *(acid acetilacetic, acid β-hidroxilbutiric și acetonă)* în sînge. Din această cauză s-a emis teoria *oxidării alternative multiple*, după care lanțul acidului gras este supus unei oxidări cu formare de grupări cetonice în poziție β față de gruparea — — COOH și în continuare oxidat la atomul de carbon care are o poziție β față de gruparea cetonică formată :

$$\ldots CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-\overset{\beta}{CH_2}-\overset{\alpha}{CH_2}-COOH$$

$$\ldots CH_2-CH_2-CO-CH_2-CO-CH_2-CO-CH_2-COOH$$

Catena acidului gras este scindată ulterior cu formare de fragmente care conțin patru atomi de carbon, dînd naștere fiecare la o moleculă de acetilacetat. Acest mecanism a fost observat pentru octanoatul marcat cu C^{14}, care incubat cu secțiuni de ficat dă naștere la două molecule de acid acetilacetic iar izotopul radioactiv este prezent în ambele molecule.

O altă sursă de formare a acetilacetatului o constituie o parte a acidului acetic, rezultat în cursul β-oxidării sub formă de acetil∼SCoA. Numeroase experiențe efectuate pe țesutul hepatic (perfuzie, secțiuni incubate, utilizarea izotopilor radioactivi pentru marcarea acetatului activat etc.) atestă faptul că din „acetatul activat" se formează acid acetilacetic.

Schema formării acetoacetatului din octanoat este redată în figura 17.8.

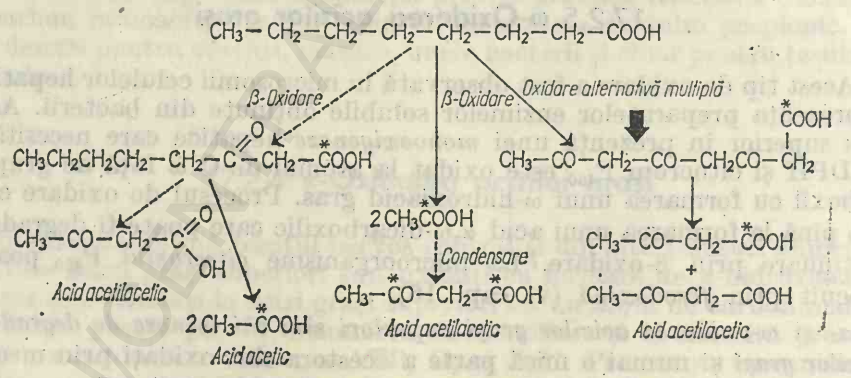
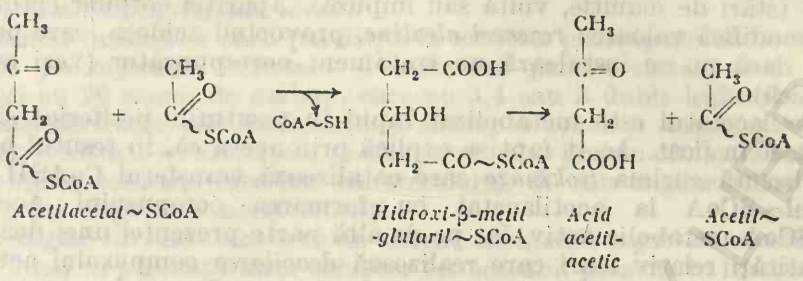


Fig. 17.8. — Formarea acidului acetilacetic din acid octanoic.

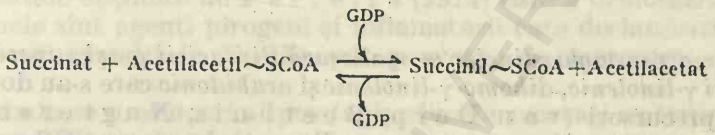
Formarea acetilacetatului din două molecule de acetat este un proces endergonic care, din această cauză, are loc numai pornindu-se de la acetil∼SCoA :

$$CH_3CO\sim SCoA + CH_3CO\sim SCoA \longrightarrow \underset{\downarrow 2\,CoA\sim SH}{CH_3-CO-CH_2-CO\sim SCoA}$$

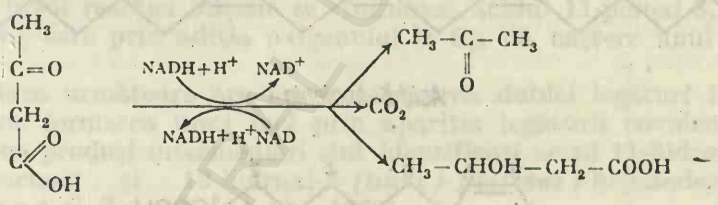
Îndepărtarea acetilcoenzimei A se realizează prin numeroase mecanisme. În țesutul hepatic procesul decurge astfel :



Această cale de transformare este deosebit de importantă deoarece β-hidroxi-β-metilglutaril~SCoA este un component care face legătura cu procesele de biosinteză a colesterolului și a terpenelor. După L y n e n (1958) acest acid este și precursorul obligator al corpilor cetonici, carè se formează în ficat. O altă posibilitate este transferul coenzimei *A* succinatului după reacția :



În continuare acidul acetilacetic este metabolizat cu formare de acetonă sau de acid β-hidroxibutiric conform uneia din următoarele reacții:



Concentrația corpilor cetonici în sînge crește considerabil (pînă la 3 mg/100 ml) cînd organismul este incapabil să utilizeze pentru acoperirea nevoilor energetice glucidele (de exemplu în *diabetul zaharat)* și cînd în acest scop utilizează grăsimile ca sursă energetică. Acidul acetic rezultat în procesul β-oxidării nu mai este degradat în ciclul K r e b s din cauza unor cantități insuficiente de piruvat și oxalacetat care se formează în metabolismul glucidelor (care este încetinit). În condițiile unei oxidări reduse „acetatul activat" se condensează cu formare de acetoacetat. Acumularea corpilor cetonici în sînge se numește *cetonemie*, eliminarea lor în urină — *cetonurie*, iar starea generală creată — *cetoză*.

Ficatul, sediul oxidării acizilor grași, rinichii, țesutul muscular, inima produc și participă la degradarea ulterioară a corpilor cronici. Apariția corpilor cetonici în unele stări patologice se datorează unor deficiențe în depozitarea și utilizarea metabolică a glucidelor (diabet zaharat), și este

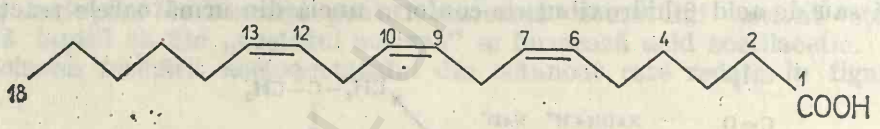
frecventă, în cazurile de intoxicare cu fosfor, cu cloroform, cu tetraclorură de carbon, des întîlnite în industria chimică, precum și după un post îndelungat (stări de inaniție, voită sau impusă). Apariția corpilor cetonici în sînge modifică valoarea *rezervei alcaline*, provocînd acidoza, care poate fi fatală dacă nu se instalează un tratament corespunzător (vezi acidoza diabetică).

Acetilacetatul este metabolizat rapid în țesuturile periferice și mult mai încet în ficat. Acest fapt se explică prin aceea că, în țesutul hepatic este absentă enzima *tiokinaza* care catalizează transferul CoASH de la succinil~SCoA la acetilacetat cu formarea compusului Acetilacetat~SCoA metabolic activ, iar pe de altă parte prezenței unei deacilaze, în cantități relativ mari care realizează *deacilarea* compusului activ.

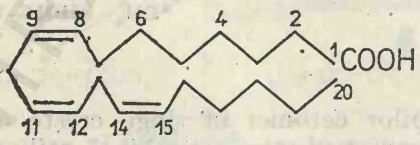
În țesuturile periferice acetilacetatul este transformat în „acetat activat" care este fie degradat, fie utilizat pentru diferite procese de biosinteză. El este, de asemenea, precursorul acizilor grași.

17.3 METABOLISMUL ȘI ACȚIUNEA BIOLOGICĂ A PROSTAGLANDINELOR

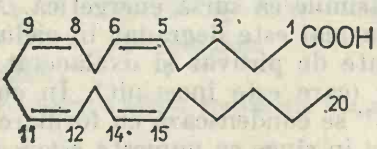
Biosinteza prostaglandinelor se realizează din acizii grași superiori esențiali—acizii γ-linolenic, dihomo-γ-linolenic și *arahidonic* care s-au dovedit cei mai buni precursori (van Dorp, Beethuis, Nugteren, Vonkerman (1964), Bergström, Danielsson, Klenberg, Samuelson (1964).



Acid δ-linolenic



Acid dihomo-δ-linolenic



Acid arahidonic

Samuelson (1965) împreună cu colaboratorii săi au arătat că *biosinteza prostaglandinelor se realizează în veziculele seminale de oaie cu participarea unui sistem enzimatic asociat cu fracția microzomială care conține*

o sintetază și în prezența unui cofactor termostabil, identificat în supernatant. Acest cofactor poate fi substituit cu acid *tetrahidrofolic, glutation redus* și cu *6,7-dimetiltetrahidropteridină.*

Sistemul enzimatic care participă la sinteza prostaglandinelor a fost denumit *prostaglandin sintetaza* și utilizează pentru sinteză acizi grași superiori cu 20 atomi de carbon, care au 3,4 sau 5 duble legături *cis-cis* (acizii *eicosatrienoic, eicosatetraenoic* și *eicosapentaenoic*). Acești acizi grași care sînt substrate în biosinteza prostaglandinelor provin din metabolismul fosfolipidelor celulare, esterilor colesterolului, di- sau triglicerolilor și din acizii grași superiori neesterificați.

Prostaglandin sintetaza este un sistem enzimatic legat de membrană, activ numai în prezența unui cofactor termostabil prezent în fracția citoplasmatică a celulei (F l o w e r, 1974). În experiențe „in vitro" pot fi folosite și fracțiile microsomale obținute din veziculele seminale de oaie și de bou, care sînt bogate în prostaglandin sintetază. F l o w e r (1974) a demonstrat că medicamentele cu acțiune antipiretică, antiinflamatorie și analgezică, de tipul aspirinei de exemplu, inhibă biosinteza prostaglandinelor. Această acțiune poate fi explicată, probabil, plecînd de la datele experimentale obținute de F e r r e i r a (1974) care a demonstrat că prostaglandinele sînt agenți pirogeni și inflamatorii care declanșează febra, în special prostaglandinele E. Ele pot provoca, de asemenea, eriteme și oedeme.

Utilizîndu-se precursori ai prostaglandinelor marcați cu tritiu și oxigen $^{18}O_2$ s-au stabilit următoarele :

— atomii de oxigen din pozițiile 9, 11 și 15 provin din oxigenul molecular, doi dintre ei provenind din aceeași moleculă (S a m u e l s o n, 1965);

— în cursul reacției inițiale se formează acidul 11-peroxi-8,12,14-eicozatrienoic, care prin adiția oxigenului la C_{15} dă naștere unui peroxid ciclic;

— în faza următoare are loc izomerizarea dublei legături 12, 13 și concomitent formarea unui inel prin apariția legăturii covalente între C_8 și C_{12}; ca produși intermediari sînt identificați acizii 11-hidroxi-8, 12, 14-eicozatrienoic și 12-hidroxi-8-*(trans)*-10*(trans)*-hepatodecadienoic (H a m b e r g și S a m u e l s o n, 1966);

— cînd în final se formează o prostaglandină reducerea se realizează numai la C_{15} și rearanjarea peroxidului ciclic nu modifică starea oxidativă a moleculei (B e r g s t r ö m, 1967).

Mecanismul biosintezei prostaglandinelor E_1 și $F_{1\alpha}$ după datele existente în lucrările lui B e r g s t r ö m și c o l a b o r a t o r i l o r săi (1964), completate cu cele publicate de S a m u e l s o n și citate mai sus este reprezentat schematic în figura 17.9.

O confirmare parțială a acestui mecanism a fost obținută prin sinteza în laborator a prostaglandinelor de către B e a l, B a b c o c k și L i n c o l n (1966).

Mecanismul reglării biosintezei prostaglandinelor nu este cunoscut. În organism *prostaglandinele au o activitate biologică relativ scurtă ca durată dar foarte intensă, în special, la nivelul ficatului și rinichilor.* După acțiunea lor *prostaglandinele sînt transformate în compuși mult mai polari și eliminați pe cale renală sau în fecale.* În primele faze de degradare au loc

reacții enzimatice care conduc la reducerea de către prostaglandin reductază a dublei legături din poziția $C_{13}—C_{14}$ și la dehidrogenarea grupării hidroxil din poziția C_{15}. Ultimul proces este realizat de o prostaglandin dehidrogenază care conține NAD^+, larg răspîndită în țesuturile mamifere-

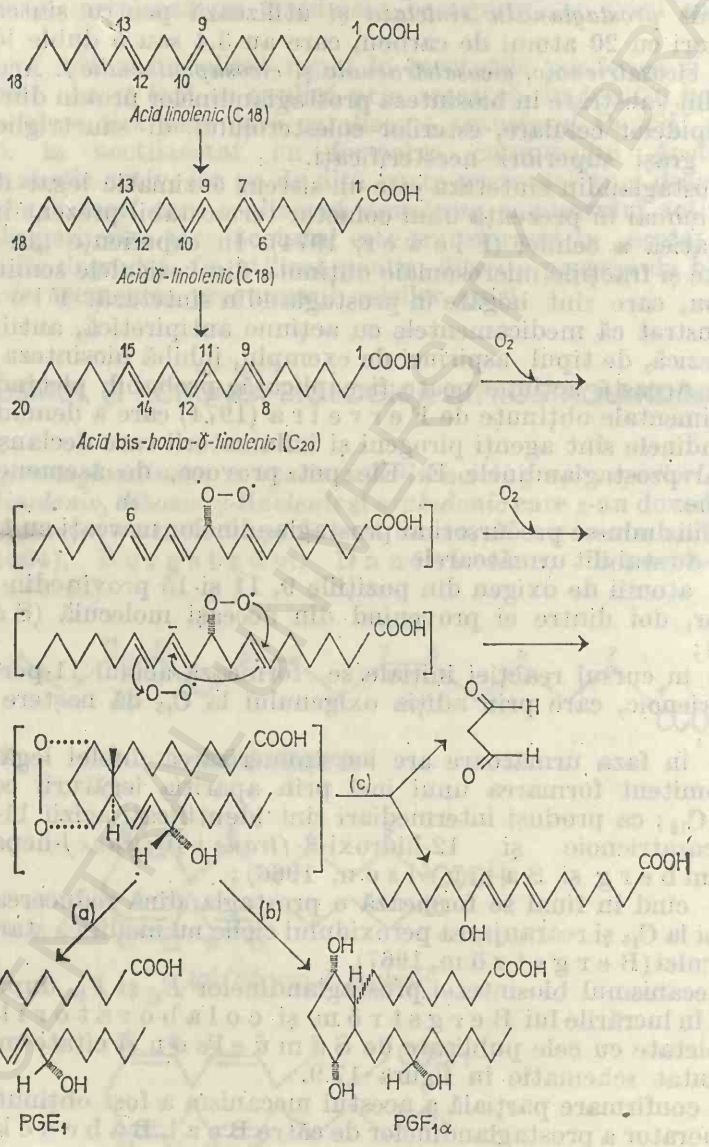


Fig. 17.9. — Biosinteza prostaglandinelor din acid linoleic (cu 18 atomi de C) după Bergström și Samuelson.

lor și specifică pentru prostaglandinele *E*, *F* și *A*. Această dehidrogenază denumită *15-hidroxi dehidrogenaza* a fost izolată din plămînul de porc și din peretele stomacului de șobolan. Ulterior, la nivelul ficatului și

după unii cercetători, posibil și la nivelul rinichilor, produșii polari rezultați după acțiunea 15-hidroxidehidrogenezei sînt degradați în continuare în cursul unui *proces de β-oxidare* a catenei care conține gruparea carboxil și prin reducerea grupării ceto prezente în ciclul pentagonal. În urma acestor transformări prostaglandinele își pierd activitatea biologică și sînt eliminate din organism.

Acțiunea biologică a prostaglandinelor. Numeroși cercetători includ prostaglandinele în categoria hormonilor pe considerentele că aceste substanțe acționează asupra țesuturilor și organelor animale în concentrații foarte mici, iar modificarea structurii lor chimice atrage după sine o modificare a activității lor biologice. Această ultimă proprietate apropie prostaglandinele de hormonii de natură steroidică, ai căror derivați de biosinteză sînt folosiți în terapeutică.

Spre deosebire de alți hormoni *prostaglandinele au o acțiune multiplă și diversificată în funcție de natura și doza utilizată, de calea de administrare și de animalul pe care se experimentează, de țesutul sau organul folosit, de factorii care însoțesc experimentul* (operație chirurgicală, anestezie etc.). Așa de exemplu, prostaglandinele din seriile *E*, *A* și *B* determină contracția uterului la șoarece și la iepure, în timp ce la femeie aceleași prostaglandine provoacă relaxarea uterului (H o r t o n e, 1965). Pe de altă parte, prostaglandinele E_2 și $F_2\alpha$ injectate intravenos femeilor gravide induc o creștere cu 43% a *ocitocinei* plasmatice în perioada travaliului de sarcină. Mecanismul lor de acțiune se pare a fi direct, stimulînd glanda hipofiză în procesul de eliberare a ocitocinei (G i l l e s p i e, B r u m m e r, C h a r d, 1972). Se presupune că prostaglandinele prezente în lichidul seminal de om sînt ușor absorbite de mucoasa vaginală și în felul acesta înlesnesc pătrunderea spermatozoizilor și apropierea lor de ovul. Cantități extrem de mici de prostaglandine administrate intravenos sau introduse direct în cavitatea uterină produc avortul spontan. PGF_2 produce și involuția corpului galben. Prostaglandinele intervin și în procesele reproducerii, determinînd ovulația la numeroase specii de mamifere, inclusiv la femeie, însă mecanismul acțiunii lor este neelucidat (P o y s e r, 1974). S-a observat de asemenea că prostaglandinele stimulează activitatea uterului în cursul sarcinii. Prostaglandinele din seriile *E* și *F* acționează și asupra musculaturii netede a tractului gastrointestinal (S é z i l l e, 1972). Pe de altă parte, la nivelul glandelor endocrine PGE_1 și PGE_2 stimulează activitatea adenilciclazei.

Acțiunea prostaglandinelor asupra sistemului cardiovascular este discutabilă. Astfel de exemplu, la om PGE_1 provoacă o scădere a tensiunii paralel cu o accelerare a ritmului cardiac, în timp ce PGF are un efect invers — determină o hipertensiune ca urmare a acțiunii lor venoconstrictoare periferică (H i n m a n, 1972; B e r g s t r ö m, 1967).

În experiențele efectuate „*in vitro*" PGE au o acțiune puternic inhibitoare asupra eliberării de *acizi grași neesterificați* din țesutul adipos, anulînd efectul stimulator al unor hormoni (ACTH, TSH glucagon, adrenalină) asupra acestui proces. Efectul inhibitor, după S é z i l l e, se dato-

rește acțiunii prostaglandinelor asupra *triglicerol lipazei* și stopării biosintezei de *acid 3',5'-adenozinmonofosforic ciclic*. Pe de altă parte, s-a emis ipoteza că PGE_1 poate activa sau inhiba biosinteza de AMP ciclic cu ajutorul unui mecanism de reglare prin retroacțiune pozitivă sau negativă (H a r t o n e, 1965), ele îndeplinind un rol de reglare a activității *adenilciclazei membranare* (fig. 17.10).

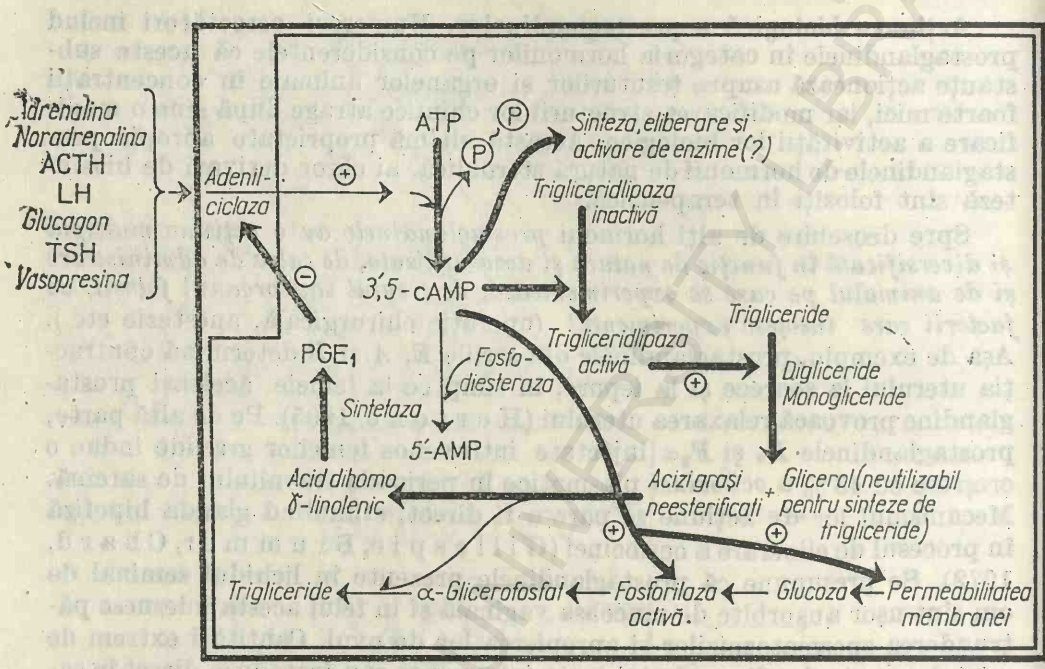


Fig. 17.10. — Mecanismul probabil de acțiune al prostaglandinelor și legăturile dintre metabolismul trigliceridelor, activarea triglicerid lipazei din țesutul adipos și sinteza de prostaglandine.

Prostaglandinele modifică, de asemenea, fluxul ionic prin membranele epiteliale. Administrarea de PGE_1 în artera renală la cîine determină o creștere a volumului urinei eliminate și o excreție mărită de ioni K^+, Cl^-, Na^+, ceea ce poate indica o relație strînsă între prostaglandine și factorul natriuretic.

Prostaglandinele exercită o acțiune tranchilizantă asupra sistemului nervos central și o acțiune stimulatoare asupra nervilor periferici. În privința acțiunii lor asupra tractului gastrointestinal se cunoaște că *inhibă secreția gastrică și stimulează motilitatea intestinală.*

Modul de acțiune al prostaglandinelor asupra țesuturilor și celulelor țintă rămîne încă neelucidat. În ultima vreme s-a demonstrat că unele formațiuni morfologice posedă receptori specifici pentru unele tipuri de prostaglandine. Astfel, în *corpora lutea* de la bovine, ovine și de la om P o w e l l și c o l a b. (1974 a, b) au demonstrat existența unor receptori specifici pentru prostaglandinele $F_{2\alpha}$ la care constantele de disociație sînt în strînsă corelație cu potențialul lor luteolitic. În *corpora lutea de la femeie* au fost

identificate două populații de receptori ai prostaglandinelor cu constante de disociație diferite; concentrația acestora raportată la mg proteină este de zece ori mai mică în comparație cu concentrația fracțiilor izolate din *corpora lutea* de la ovine și bovine. Legarea prostaglandinei $F_{2\alpha}$ la receptor este condiționată de gruparea carboxil și de cele trei grupări hidroxil. Receptorul este sensibil la tratarea cu tripsină, protează și fosfolipază *A*.

Întrebarea pe care și-o pune B e r g s t r ö m în 1967 dacă prostaglandinele sînt „în principal modulatori metabolici intracelulari sau reglatori hormonali sistemici" își păstrează actualitatea și răspunsul depinde de elucidarea mecanismului de acțiune fiziologică al prostaglandinelor și de rezultatele studiilor privind metabolismul lor în organism.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

18

METABOLISMUL COLESTEROLULUI, COMPUȘILOR IZOPRENOIDICI ȘI LIPIDELOR COMPLEXE

Colesterolul este cel mai comun și mai răspîndit sterol, întîlnindu-se în regnurile vegetal și animal sub formă liberă sau esterificată. Absorbția lui din lumenul intestinal este dependentă de prezența acizilor biliari și în timpul acestui proces este esterificat cu acizi grași, apărînd în *chilomicronii* limfatici sub formă esterificată.

18.1 BIOSINTEZA COLESTEROLULUI

Majoritatea colesterolului prezent în țesuturile animalelor superioare și omului nu este de proveniență alimentară, ci reprezintă rezultatul biosintezei colesterolului din acetil~SCoA format în cursul metabolismului intermediar al zaharurilor, acizilor grași și aminoacizilor. *Colesterolul este sintetizat aproape în toate țesuturile vertebratelor, dar sediul principal al biosintezei lui la om și la vertebratele superioare este ficatul, intestinul, glandele suprarenale și gonadele. Biosinteza colesterolului în celulă se desfășoară în citoplasmă* și majoritatea enzimelor necesare acestui proces sînt localizate în reticulul endoplasmatic.

Mecanismul biosintezei colesterolului a fost studiat pe șobolanul alb; unele etape importante nu au putut fi studiate decît *in vitro* în prezența enzimelor izolate din levuri care sintetizează colesterol. Cunoștințele actuale despre biosinteza colesterolului pledează în favoarea faptului că *sinteza structurii fundamentale a sterolilor se realizează după un mecanism unic.* Particularitățile de structură privind catena laterală a unor steroli vegetali sînt realizate în ultimele etape de biosinteză prin reacții încă puțin cunoscute.

Principalele etape ale biosintezei colesterolului sînt redate în figura 18.1 *a* şi *b*.

Prima etapă în biosinteza colesterolului constă în sinteza β-*hidroximetilglutaril~SCoA* care se realizează prin condensarea a două molecule de acetil~SCoA cu formare de acetoacetil~SCoA; o nouă condensare a acestuia cu o altă moleculă de acetil~SCoA se soldează cu sinteza hidroximetilglutaril~SCoA. Acetoacetil~SCoA, metabolit intermediar cu patru atomi de carbon care se găseşte în citoplasmă legat covalent cu *proteina purtătoare de acil* (ACP) din *complexul sintetazei acizilor graşi*, constituie în acelaşi timp principala sursă de formare a β-hidroximetilglutaril~SCoA.

In etapa a doua acidul 3-hidroxi-3-metilglutaril~SCoA sub acţiunea enzimei *hidroximetilglutaril CoA reductaza*, sulfidril enzimă care necesită

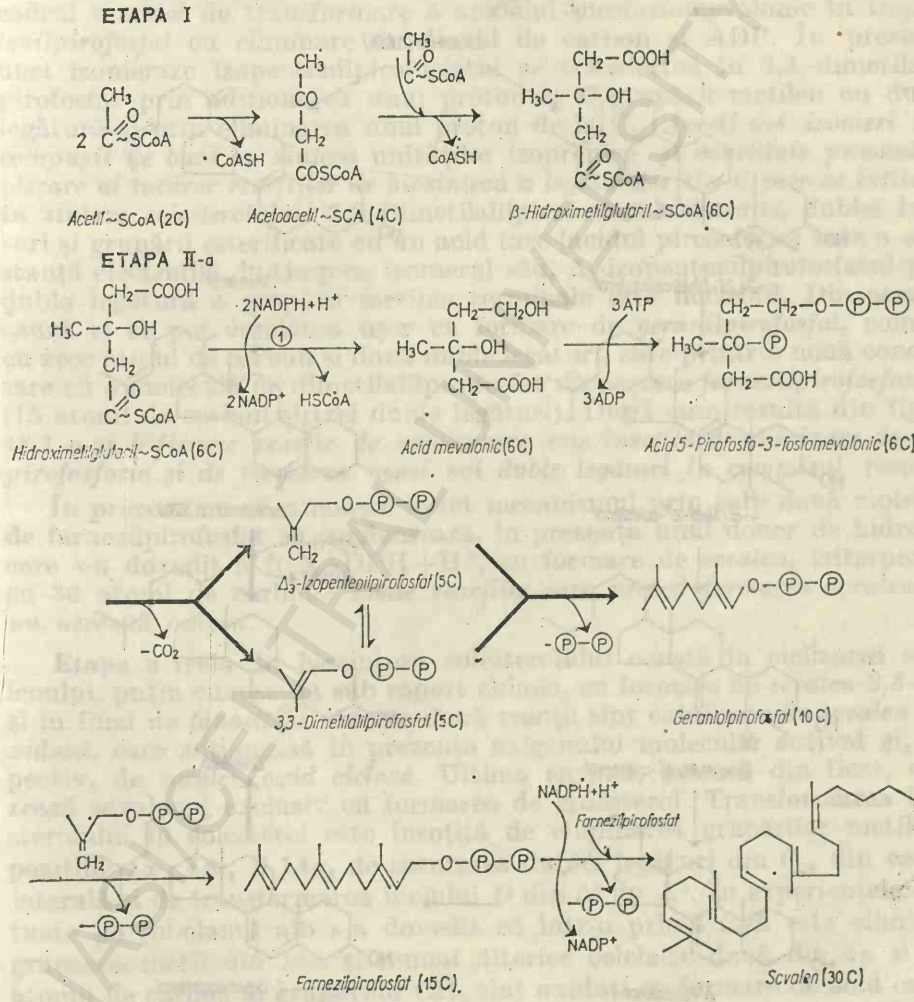


Fig. 18.1.
***a* — Etapele principale ale biosintezei colesterolului la vertebrate.**

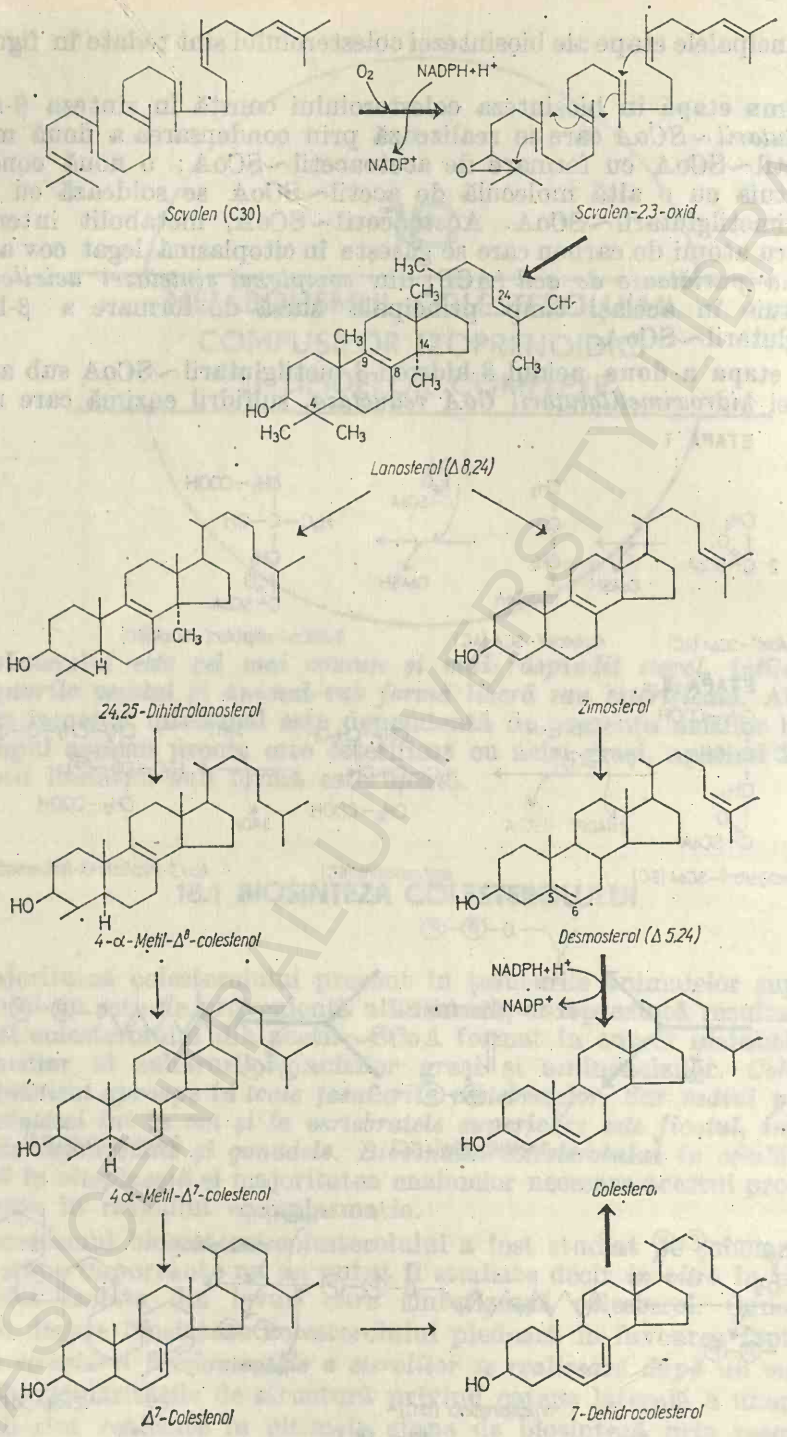


Fig. 18.1. b — Etapele principale ale biosintezei colesterolului la vertebrate.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

NADPH, este transformat, prin reducerea grupării carboxil esterificate, în *acid mevalonic*. La nivelul acestei reacții pot interveni diferiți factori care reglează biosinteza colesterolului. Acest lucru este cu atît mai probabil cu cît acidul mevalonic se formează și în cursul reacției de condensare a acetil~SCoA cu cetoacetil-ACP cu formare de hidroximetilglutarat legat covalent la proteină, intermediar care poate fi redus la acid mevalonic. S-a constatat, de asemenea, că ficatul animalelor în *inaniție* sintetizează mici cantități de colesterol, și atunci cînd activitatea hidroximetilglutarilreductazei este redusă în comparație cu starea normală. Acidul mevalonic este fosforilat în prezența ATP și în cursul a două reacții succesive catalizate de două enzime distincte, cu formare de *acid-5-fosfomevalonic* și *acid 5-pirofosfomevalonic*; se presupune că *acidul trifosfomevalonic* ar fi un intermediar în reacțiile de trecere de la acidul mevalonic la izopentenilpirofosfat. A treia moleculă de ATP este utilizată în cadrul reacției de transformare a acidului pirofosfomevalonic în *izopentenilpirofosfat* cu eliminare de dioxid de carbon și ADP. În prezența unei izomeraze izopentenilpirofosfatul se transformă în 3,3,-dimetilalilpirofosfat prin adiționarea unui proton la C grupării metilen cu dublă legătură și prin eliminarea unui proton de la C_2. *Acești doi izomeri sînt compușii de bază în sinteza* unităților izoprenice *și constituie punctul de plecare al tuturor reacțiilor de biosinteză a legăturilor C—C care se întîlnesc în sinteza colesterolului.* 3,3-Dimetilalilpirofosfatul datorită dublei legături și grupării esterificate cu un acid tare (acidul pirosoforic) este o substanță electrofilă, în timp ce izomerul său, Δ_3-izopentenilpirofosfatul prin dubla legătură a grupării metilen terminale este nucleofil. Din această cauză ei se pot condensa ușor cu formare de *geranilpirofosfat*, compus cu zece atomi de carbon și două duble legături, care printr-o nouă condensare cu o moleculă de dimetilalilpirofosfat dă naștere *farnezilpirofosfatului* (15 atomi de carbon și trei duble legături). După cum rezultă din figura 18.1 *a* și *b fiecare reacție de condensare este însoțită de eliminare de acid pirofosforic și de formarea unei noi duble legături în compusul rezultat.*

În prezent nu se cunoaște exact mecanismul prin care două molecule de farnezilpirofosfat se condensează, în prezența unui donor de hidrogen care s-a dovedit a fi $NADPH+H^+$, cu formare de *scvalen*, triterpenoid cu 30 atomi de carbon. *Toate reacțiile care preced formarea scvalenului nu necesită oxigen.*

Etapa a treia în biosinteza colesterolului constă în ciclizarea scvalenului, puțin cunoscută sub raport chimic, cu formare de *scvalen-2,3-oxid* și în final de *lanosterol*. Aceste două reacții sînt catalizate de *scvalen epoxidază*, care acționează în prezența oxigenului molecular activat și, respectiv, de *scvalen oxid ciclază*. Ultima enzimă, extrasă din ficat, ciclizează scvalenul exclusiv cu formarea de lanosterol. Transformarea lanosterolului în colesterol este însoțită de eliminarea grupărilor metil din pozițiile 4α-, 4β-, și 14α, de saturarea dublei legături din C_{24} din catena laterală și de transformarea inelului *D* din Δ^8 în Δ^5. În experiențele efectuate pe șobolanul alb s-a dovedit că într-o primă fază este eliminată gruparea metil din 14α și numai ulterior celelalte două din 4α și 4β: atomii de carbon ai grupărilor CH_3 sînt oxidați cu formare de acid carboxilic și eliminați sub formă de dioxid de carbon. Ca rezultat al acestor

transformări se formează *zimosterolul*, care la şobolanul alb s-a dovedit a fi un precursor al colesterolului. Zimosterolul a fost izolat şi din levuri. În cursul unei reacţii directe legătura Δ^8 gliseză în Δ^5 dînd naştere la *desmosterol*, care ulterior în cursul unei reacţii de reducere a dublei legături Δ^{24} trece în *colesterol*. (B l o c h, 1959; J o h n s t o n şi B l o c h, 1957).

Lanosterolul poate fi transformat şi în cursul reacţiilor redate în stînga figurii 18.1 *b*, compusul 24, 25-dihidrolanosterolul însoţindu-l în toate preparatele izolate din surse animale. Compuşii intermediari în sinteza colesterolului care au catena laterală saturată au fost izolaţi din derma de şobolan normal. Nu se poate afirma dacă cele două căi care apar după sinteza lanosterolului sînt concomitente sau se exclud una pe alta, însă existenţa sterolilor cu catenă laterală nesaturată lasă să se înţeleagă posibilitatea şi altor procedee de biosinteză a sterolilor naturali (B l o c h, 1960).

În experienţele efectuate cu izotopi radioactivi ai carbonului $^{14}CH_3COOH$ *şi* $CH_3{}^{14}COOH$ *s-a demonstrat că toţi atomii de C ai colesterolului derivă din acetat. Aceeaşi situaţie este valabilă şi pentru ergosterol, a cărui grupare metil în* C_{24} *provine din reacţia de metilare cu* S-adenozilmetionina. *Sursa unităţilor izoprenice utilizate în biosinteza colesterolului o constituie acidul mevalonic, care îndeplineşte acelaşi rol şi în cazul biosintezei carotenoizilor, a cauciucului, şi a catenei izoprenice a coenzimei Q.*

Biosinteza colesterolului este un proces biochimic care necesită un consum considerabil de substrate, de energie şi de agenţi de reducere. Pentru sinteza unei singure molecule sînt necesare 18 mol acetil~SCoA, 36 mol ATP şi 16 mol de NADPH. Din cei 36 atomi de carbon, proveniţi din cele 6 molecule de hidroximetilglutaril~SCoA utilizate, numai 27 sînt regăsiţi în colesterol.

Reglarea biosintezei colesterolului. *Biosinteza colesterolului este reglată de factori exogeni, cantitatea de colesterol în alimente, puterea calorică a acestora, stările de inaniţie, şi de factori endogeni de natură hormonală, de acizii biliari.* Starea de inaniţie diminuează biosinteza colesterolului prin micşorarea concentraţiei acetil~SCoA, ATP şi NADPH, iar *colesterolul alimentar* are un puternic efect de inhibiţie prin feedback asupra biosintezei colesterolului în ficat, dar nu afectează biosinteza acestuia în intestinul subţire. Inhibiţia sintezei la nivelul ficatului se datoreşte unei sinteze reduse de hidroximetilglutaril~SCoA, enzimă care limitează procesul de biosinteză şi are un ritm diurn, activitatea ei înregistrînd un maxim ziua şi fiind minimă la orele 24. *Hormonii estrogeni* inhibă sinteza colesterolului acţionînd asupra aceleiaşi enzime şi diminuînd viteza de formare a hidroximetilglutaril~SCoA, în timp ce *acizii biliari* influenţează direct sinteza colesterolului în mucoasa intestinală, inhibînd-o, şi indirect — la nivelul ficatului prin capacitatea lor de a media absorbţia colesterolului alimentar. S-a avansat, de asemenea, şi ipoteza că o proteină prezentă în *bilă* este adevăratul inhibitor al sintezei colesterolului, dar dovezi experimentale directe nu există.

Concentraţia colesterolului în plasma sangvină a omului normal adult variază între 120—240 mg% şi aproximativ 65% din acesta se găseşte sub formă esterificată. Aproximativ 60% din colesterolul total prezent în plasmă se găseşte sub forma complecşilor lipoproteici fiind un compo-

nent structural al acestora *(lipoproteine cu densitate mică* şi *lipoproteine cu densitate mare*, v. cap. 7), complecşi care se află într-un echilibru permanent cu colesterolul din ţesuturi. Din această cauză explorarea clinică a colesterolului plasmatic poate furniza date despre viteza de sinteză şi de reînnoire a colesterolului tisular.

Esterificarea colesterolului are loc în ficat, intestin şi glandele suprarenale şi se realizează pe două căi:

— acizii graşi sînt activaţi prin esterificarea lui cu CoASH dînd naştere acetil~CoA. Acest proces se realizează în prezenţa ATP ca sursă de energie şi a enzimei *colesterolester sintetaza*. Acil~SCoA rezultaţi, în prezenţa enzimei *acil CoA colesterol aciltransferaza*, reacţionează cu colesterolul cu formare de CoASH şi colesterol esterificat. Acest procedeu de esterificare se întîlneşte în ţesuturi;

— în plasmă esterificarea colesterolului este realizată de *fosfatidilcolin aciltransferaza*, care transferă direct acidul gras din poziţia β a fosfatidilcolinei la colesterol, rezultînd *lizofosfatidilcolină* şi colesterol esterificat.

Enzima este sintetizată în ficat şi eliberată în plasma sanguină unde acţionează esterificînd colesterolul liber pus în circulaţie tot de ficat. Hidroliza esterior colesterolului se realizează de către *colesterolesteraze*, prezente în majoritatea ţesuturilor şi în sucul pancreatic.

18.2 CATABOLISMUL COLESTEROLULUI

Acizii biliari sînt principalii produşi metabolici ai colesterolului şi conţin 24 atomi de carbon. În cursul sintezei lor din colesterol dubla legătură din inelul *B* este redusă, iar catena laterală este scurtată cu trei atomi de carbon (v. capitolul 12 şi fig. 18.2).

Oxidarea catenei laterale a colesterolului se face în prezenţa CoASH şi se soldează cu formarea unui colil~SCoA sau chenodeoxicolil~SCoA şi a propionil~SCoA (fig. 18.2). Biosinteza acizilor biliari în ficat este reglată de cantitatea de acizi biliari care este recirculată de la intestin la ficat şi de concentraţia colesterolului transportat din intestin la ficat (concentraţiile mari stimulează secreţia de acizi biliari). Ei pot fi eliminaţi din ficat direct în duoden sau pot fi depozitaţi în vezica biliară, cînd nu sînt imediat necesari pentru realizarea proceselor de digestie. Bila conţine pe lîngă acizii biliari şi colesterol, fosfolipide, apă, săruri minerale, bilirubină şi este deversată în intestin sub acţiunea *colecistochininei*, hormon de natură polipeptidică (cap. 1).

Cînd solubilitatea colesterolului în bilă scade, deoarece se modifică raportul colesterol/săruri biliare + fosfolipide şi acest raport devine mai mic de 1/11, bila este suprasaturată cu colesterol şi acesta se depune sub formă de microcristale care pot conduce la formarea de *calculi biliari*. Acest mecanism de saturare temporară a bilei cu colesterol se întîlneşte şi la oamenii sănătoşi însă formarea calculilor biliari nu se face deoarece cristalele de colesterol se redizolvă cînd bila devine din nou nesaturată în colesterol. Bila litogenică dă naştere calculilor biliari deoarece bila rămîne un timp foarte îndelungat saturată cu colesterol.

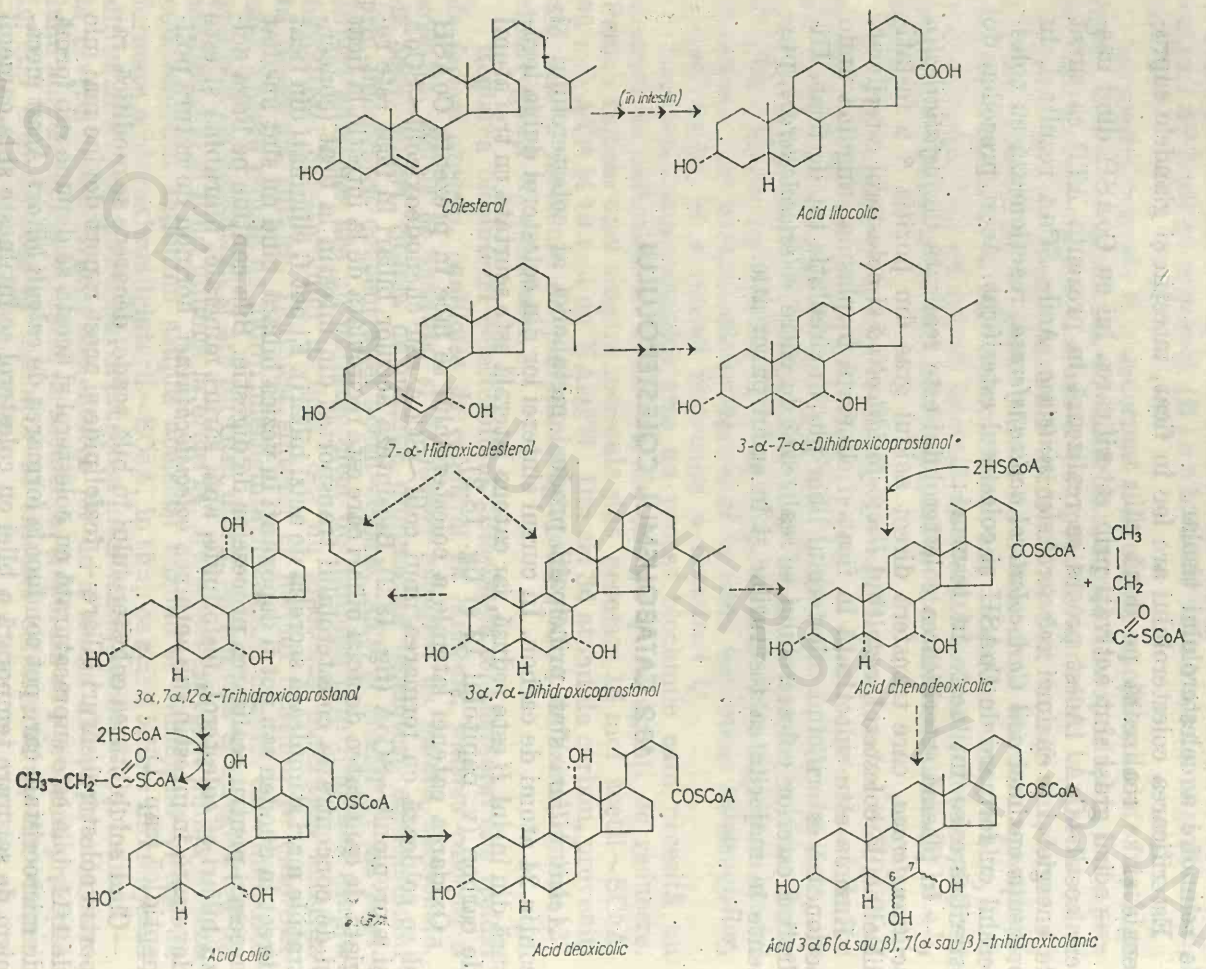


Fig. 18.2 — Schema genezei acizilor biliari din colesterol.

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITARA LIBRARY

Pentru dizolvarea calculilor biliari se recomandă β-*glicerofosfat* administrat pe cale orală, care are un efect specific asupra concentrației fosfolipidelor biliare și hepatice, determinînd o creștere a concentrației acestora prin inducerea sintezei lor (L i n s c h e e r, R a h e j a, 1974).

Acidul chenodeoxicholic este folosit în practica medicală pentru tratamentul colesterol colelitiazelor și aterosclerozei și în cazul omului s-a dovedit a nu fi toxic. La animale, de exemplu, la *Macaca mulatta* acidul chenodeoxicolic este hepatotoxic și teratogen (B e l l, W h i t n e y și D o w l i n g, 1972) deoarece în circulația enterohepatică crește concentrația acidului biliar litocolic, paralel cu creșterea *leucinaminopeptidazei* serice; între dozele de acid chenodeoxicholic administrate, hepatoxicitate și nivelul acidului litocolic există o oarecare proporționalitate (S a l e n, D r y s z k a, C h e n, S a l t z m a n, M o s b a c h, 1974). Selecția acizilor biliari de către ficat este stimulată de *hepatocrinină*, substanță de natură hormonală. Ambii hormoni sînt elaborați de intestin și eliberați sub acțiunea chimului alimentar la nivelul duodenului. Circuitul enterohepatic al colesterolului și acizilor biliari este redat schematic în figura 18.3.

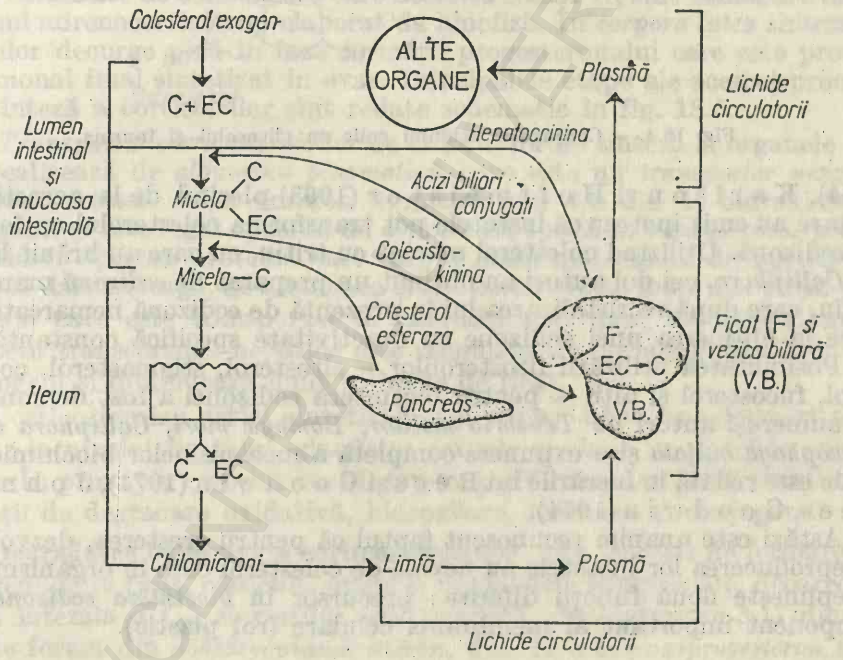


Fig. 18.3. — Digestia, absorbția și circulația colesterolului în organismul animal. Colesterolul liber (C) și esterificat (EC) sînt incorporați în micelele din lumenul intestinal care conțin fosfolipide și acizi biliari conjugați și sînt emulsionați; esterii colesterolului sînt hidrolizați de colesterol esteraza pancreatică, și absorbiți din micele sub formă de colesterol liber printr-un proces de difuzie prin celulele mucoasei ileumului. În timpul difuziei colesterolul liber este din nou esterificat în cea mai mare parte și incorporat în particulele lipoproteice care sînt deversate în limfă, în plasma sangvină și în cele din urmă ajung în ficat unde colesterolul este depozitat sau metabolizat.

În ficat acizii colic şi chenodeoxicolic sînt conjugaţi cu *glicocolul* şi *taurina*, formînd *acid glicocolic* şi *acid taurocholic*; se presupune că acizii biliari excretaţi de ficat către bilă se găsesc sub formă conjugată, în cea mai mare parte (v. fig. 18.4).

Deşi insectele nu pot să sintetizeze colesterolul din precursori metabolici mai simpli (acid acetic, acid mevalonic) ele pot transforma totuşi diferiţi compuşi sterolici prezenţi în hrana lor în colesterol (v. mai sus, G i l b e r t,

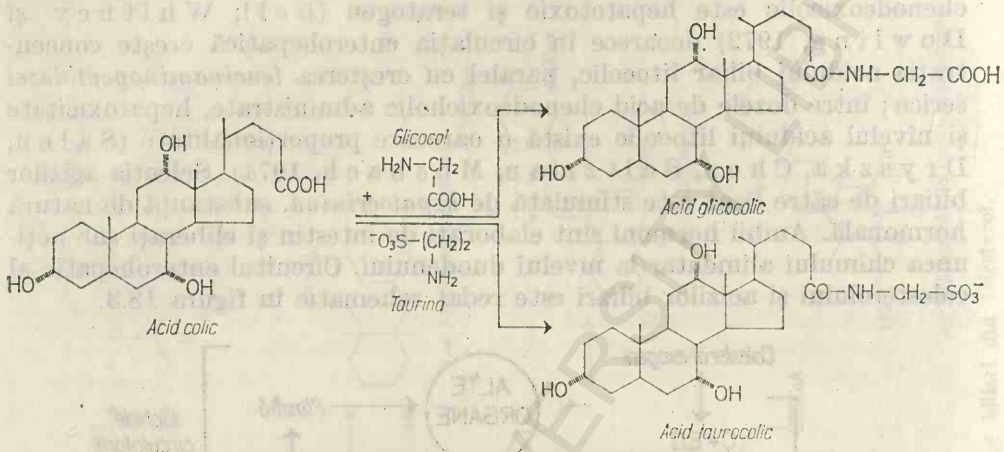


Fig. 18.4. — Conjugaţii acidului colic cu glicocolul şi taurina.

1964). K a r l s o n şi H o f f m e i s t e r (1963) plecînd de la această constatare au emis ipoteza că insectele pot transforma colesterolul cu formare de ecdizonă. Utilizînd colesterol marcat cu tritiu, cu care au hrănit larvele de *Calliphora*, cei doi autori au obţinut un preparat de *ecdizonă* marcat cu tritiu, care după recristalizarea lui în prezenţă de ecdizonă nemarcată conduce la obţinerea unei ecdizone cu o activitate specifică constantă.

Posibilitatea utilizării fitosterolilor — sitosterol, stigmasterol, compesterol, fucosterol şi alţii — pentru biosinteza ecdizonei a fost demonstrată de numeroşi autori pe *Tenebrio molitor*, *Bombyx mori*, *Calliphora stygia*, *Sarcophaga bullata* şi o expunere completă a mecanismelor biochimice posibile este redată în lucrările lui R e e s şi G o o d w i n (1974), J o h n s o n, R e e s, G o o d w i n (1974).

Astăzi este unanim recunoscut faptul că pentru creşterea, dezvoltarea şi reproducerea lor insectele au nevoie de colesterol care în organismul lor îndeplineşte două funcţii diferite: precursor în *biosinteza ecdizonelor* şi component important al membranei celulare (rol plastic).

18.3 METABOLISMUL COLESTEROLULUI ŞI HORMONILOR STEROIZI

Testiculele, ovarele, placenta şi cortexul glandelor suprarenale sînt capabile să sintetizeze colesterol plecînd de la acetil∼SCoA. Colesterolul astfel sintetizat, împreună cu o parte a colesterolului circulant este metabolizat în organele enumerate mai sus cu formare de *hormoni steroizi*.

Hormonii steroizi C_{21} *sînt biosintetizați în partea corticală a glandelor suprarenale din colesterol* via 20 α-hidroxicolesterol și 20α,22-dihidroxicolesterol, primul steroid C_{21} care poate fi identificat în țesutul cortical fiind *pregnenolonul*, transformat în cea mai mare parte în *progesteron*, iar aceasta ulterior în compuși C_{21} oxigenați. Transformarea progesteronului în hormoni corticosteroizi poate să se realizeze pe două căi diferite după cum procesul de hidroxilare are loc la nivelul atomului C_{17} în poziția α dînd naștere 17-α-hidroxiprogesteronului sau în poziția C_{21} cu formare de *deoxicorticosteron*. Deoxicorticosteronul și derivatul său 17α-hidroxideoxicorticosteronul sînt hidroxilați la nivelul C_{11} cu formare de *corticosteron* și *cortizol*, produși care printr-o oxidare ulterioară în C_{11} sînt transformați parțial în *11-dehidrocorticosteron* și *cortizon* — două substanțe cu o remarcabilă activitate fiziologică (fig. 18.5).

Aldosteronul se formează, probabil, prin hidroxilarea deoxicorticosteronului în poziția C_{18} urmată de oxidare ulterioară cu formare de 18-hidroxicorticosteron. *Sinteza* lui *are loc în zona glomerulară a cortexului glandelor suprarenale.*

Reacțiile în cursul cărora colesterolul se transformă în pregnenolon sînt catalizate de o *desmolază* care necesită NADPH, sînt stimulate de hormonul adrenocorticotrop elaborat de hipofiză. În *corpora lutea* sinteza steroizilor decurge pînă în faza formării progesteronului care este produsul hormonal final sintetizat în ovar. Principalele etape ale acestui proces de biosinteză a corticoizilor sînt redate schematic în fig. 18.5.

Transportul corticosteroizilor de la locul lor de sinteză la organele țintă se realizează de *albumina plasmatică*, care este un *transportor nespecific* pentru cortizol. Acest hormon formează însă 4/5 din 17-hidroxisteroizii sanguini și este legat specific de o proteină specială, *transcortina*, produsă de ficat. Această proteină care are o masă moleculară de aproximativ 52 000 daltoni leagă, de asemenea și *corticosteronul* și mult mai puțin *aldosteronul* care este transportat în cantități mai mari de către albumină. Sinteza transcortinei hepatice este stimulată de hormonii tiroidieni și de estrogeni și diminuează mult în bolile de ficat.

Corticosteroizii astfel sintetizați sînt supuși unor transformări numeroase la nivelul ficatului, glandelor sexuale și chiar în glandele suprarenale. În principiu reacțiile care însoțesc modificarea lor pot fi clasificate în reacții de degradare oxidativă, hidroxilare, reducere și conjugare.

Degradarea oxidativă a corticosteroizilor este însoțită de formarea androgenilor în ficat, testicule, ovare și în glandele suprarenale, deoarece catena laterală a C_{21} steroizilor este scindată. Δ^4-Androsten-3,17-diona se poate forma din *dehidroepiandrosteron*, din *17-α-hidroxiprogesteron* și din *testosteron* (fig. 18.5), precum și indirect din *17-α,20α-dihidroxicolesterol.* În testicule precursorul principal al testosteronului rămîne progesteronul care este degradat cu formarea derivatului său hidroxilat în poziția 17α.

Hidroxilarea corticosteroizilor. În cortexul glandelor suprarenale este posibilă hidroxilarea steroizilor C_{19} și C_{21} și în pozițiile 6α, 6β și 16. Glandele suprarenale de șobolan alb sînt capabile să hidroxileze în C_6, iar cele de porc în $C_{16}\alpha$.

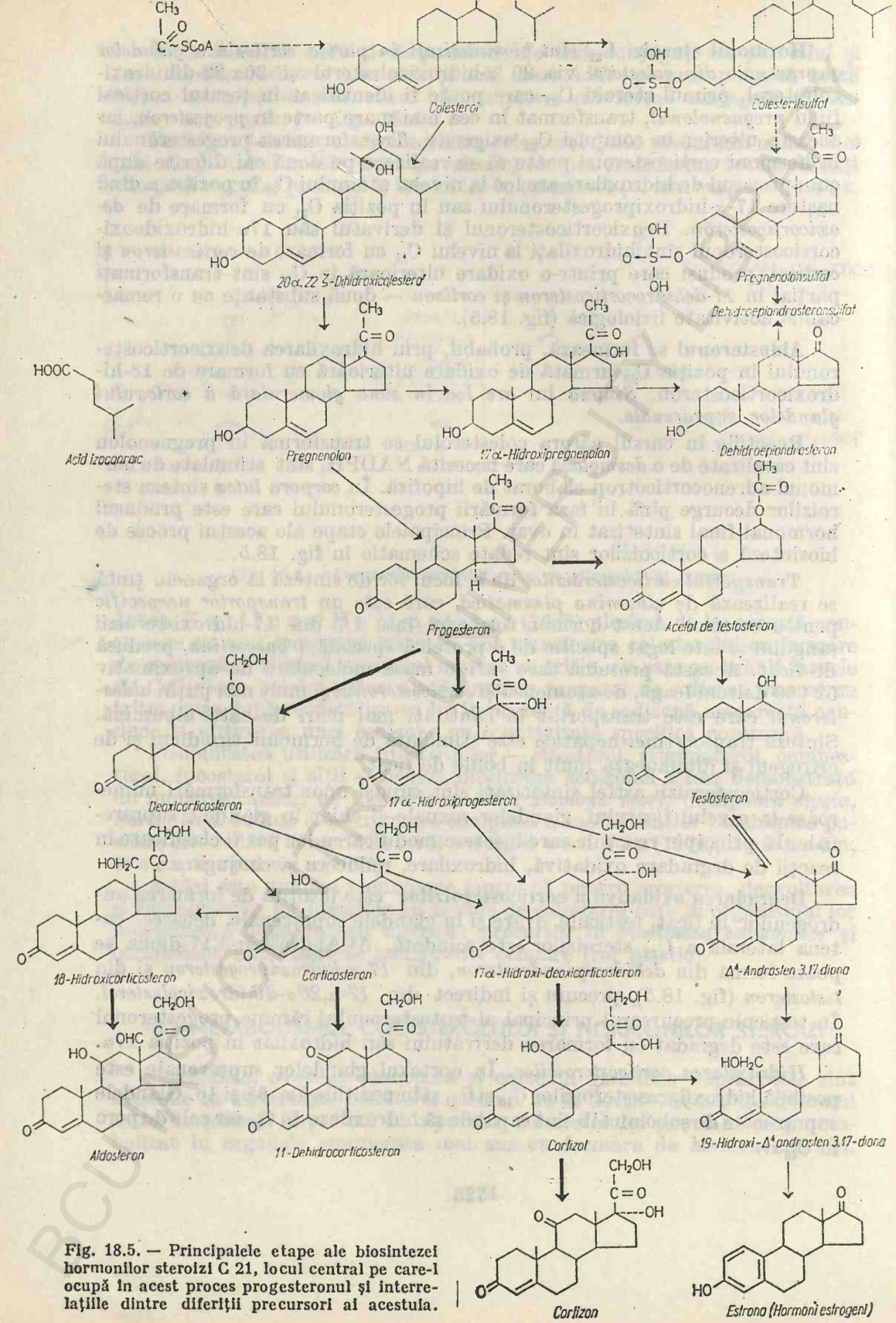
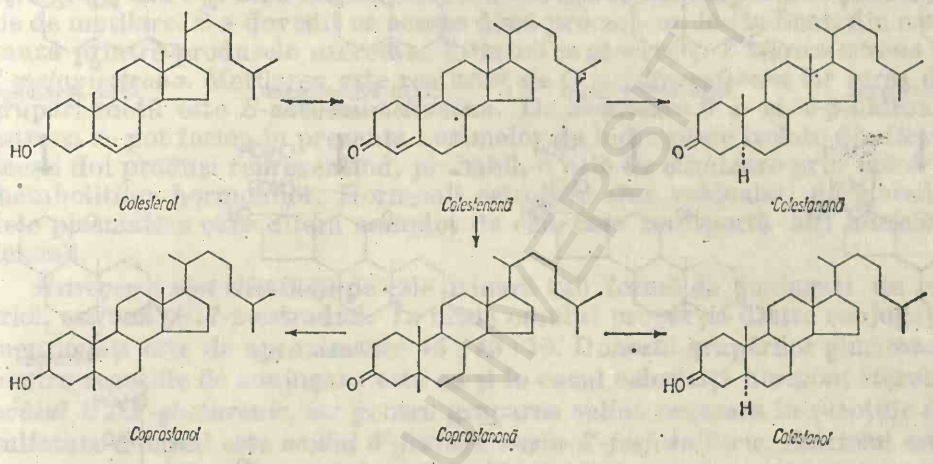


Fig. 18.5. — Principalele etape ale biosintezei hormonilor steroizi C 21, locul central pe care-l ocupă în acest proces progesteronul și interrelațiile dintre diferiții precursori ai acestuia.

Reducerea corticosteroizilor. Metaboliții reduși ai corticosteroizilor și eliminați în urină aparțin ca structură chimică fie seriei 3α-hidroxi-5β, de exemplu, *pregnanul* (C_{21}) și *etiocolanul* (C_{19}), fie seriei 3-α-hidroxi-5-α, ca de exemplu, *allopregnanul* (C_{21}) și *androstanul* (C_{19}). Reducerea sistemului Δ^4-3-ceto din inelul *A* al hormonilor corticosteroizi se face treptat sub acțiunea Δ^5-*steroid reductazei*. Reducerea poate avea loc și la nivelul atomului C_{20} și în acest caz gruparea ceto este transformată în hidroxil *in vivo*, formîndu-se după toate probabilitățile, derivați α-hidroxilați.

În lumenul intestinal colesterolul sub influența florei bacteriene este redus parțial cu formare de *coprostanol*, *colestanol* și *coprostanonă* și este eliminat pe cale fecală. Unele transformări de acest fel se întîlnesc și în ficat, de exemplu, reducerea colestenonei la colestanol :



Derivații reduși ai colesterolului nu mai sînt reabsorbiți din lumenul intestinal.

18.4 CONJUGAREA ȘI EXCREȚIA CORTICOSTEROIZILOR

Cortizonul și cortizolul sînt excretați în urină sub formă liberă, dar majoritatea steroizilor C_{21} sînt transformați în ficat în conjugați cu *acidul glucuronic* și cu *sulfați*, restul glucuronozil fiind transferat de la *acidul UDP-glucuronic* și formîndu-se în principal β-glucuronizi. Unii hormoni, de exemplu, dehidroepiandrosteronul și androsteronul sînt eliminați sub formă de sulfoconjugați care se formează fie în ficat, fie sînt sintetizați direct sub formă de sulfați (fig. 18.5).

În figura 18.6 sînt redate căile principale ale reacțiilor reversibile de oxido-reducere care au loc în ficat și sînt realizate și în alte țesuturi ale principalilor hormoni cetocorticosteroizi. Produșii metabolici rezultați sînt biologic inactivi.

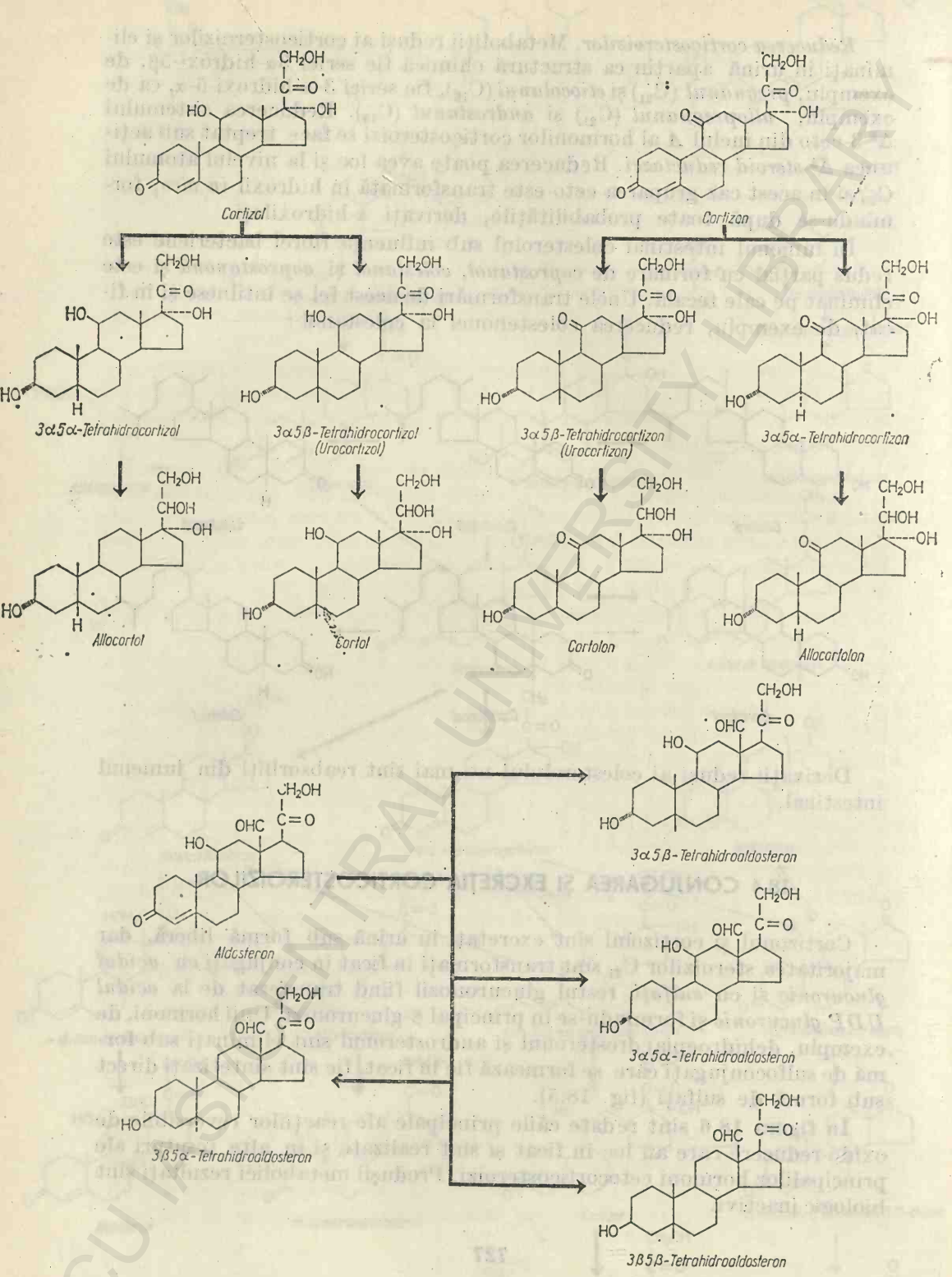


Fig. 18.6. — Transformările hormonilor cetocorticosteroizi în ficat şi în alte ţesuturi prin reacţii de oxidoreducere şi geneza produşilor metabolici biologic inactivi.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

18.5 BIOSINTEZA HORMONILOR ESTROGENI

Principalul loc al biosintezei hormonilor estrogeni este ovarul, iar etapele intermediare cuprind sinteza colesterolului din acetil~SCoA și transformarea lui în *pregnenolon* și *progesteron*. Aromatizarea inelului *A* se face în stadiul de compus care conține C_{19} cînd gruparea metil de la atomul de carbon C_{19} este oxidată la aldehidă sau grupare alcoolică primară și eliminată sub formă de formaldehidă în urma scindării legăturii covalente dintre C_{10} și C_{19}. Se presupune că sistemul enzimatic care realizează reacțiile redate în figura 18.7 este nespecific față de structura substratelor pe care le transformă. Hidroxilarea estronei poate fi realizată în poziția C_2, C_6, C_{11}, C_{16} sau C_{18}. Cînd estrona este hidroxilată în C_2 este posibilă și o reacție de metilare. S-a dovedit că aceste două procese au loc în ficat, din care cauză printre produsele excretate în urină se găsește și *2-hidroxiestrona* și *2-metoxiestrona*. Metilarea este realizată de *O-metiltransferaza* iar sursa de grupări metil este *S-adenozilmetionina*. De asemenea,6-α- și 6-β-hidroxiestrona se pot forma în prezența enzimelor de hidroxilare izolate din ficat, acești doi produși reprezentînd, probabil, o cale de eliminare prin urină a metaboliților hormonilor. Hormonii estrogeni sînt vehiculați de globulinele plasmatice care diferă complet de cele care transportă alți hormoni sexuali.

Estrogenii sînt eliminați pe cale urinară sub formă de conjugați de estriol, estronă și 17-β-estradiol. În urina omului proporția dintre conjugații menționați este de aproximativ 45 : 45 :10. Donorul grupărilor glucuronil pentru reacțiile de conjugare este ca și în cazul celorlalți hormoni steroizi *acidul UDP-glucuronic*, iar pentru gruparea sulfat necesară în reacțiile de sulfatare donorul este *acidul 3'-fosfoadenozin-5'-fosfosulfuric*. Estriolul este excretat în același timp sub formă de 16- și 17-glucuronoconjugați în timp ce estrona numai sub formă 3-glucuronoconjugați; sulfoconjugații estronei și estriolului se formează numai la nivelul grupării hidroxil de la C_3.

18.6 OXIDAREA MICROBIOLOGICĂ A STEROIZILOR

Sterolii, substanțele izoprenice și izoprenoidice, alcaloizii și hidrocarburile pot fi oxidate de microorganisme și de ciupercile inferioare, rezultînd compuși care în mod obișnuit se obțin greu prin metode chimice de sinteză. De regulă, substituirea hidrogenului la nivelul atomului de carbon reactivat este o reacție stereospecifică care are loc fără modificarea configurației compusului oxidat, iar oxigenul introdus în moleculă este de cele mai multe ori oxigen molecular. În majoritatea cazurilor randamentul reacțiilor de oxidare microbiologică sau fungică este mult superior unor metode chimice de sinteză, reacția poate fi realizată în condiții relativ ușoare și avantajoase și se obțin produși care pot constitui o materie primă extrem de prețioasă pentru prepararea substanțelor farmacologic active.

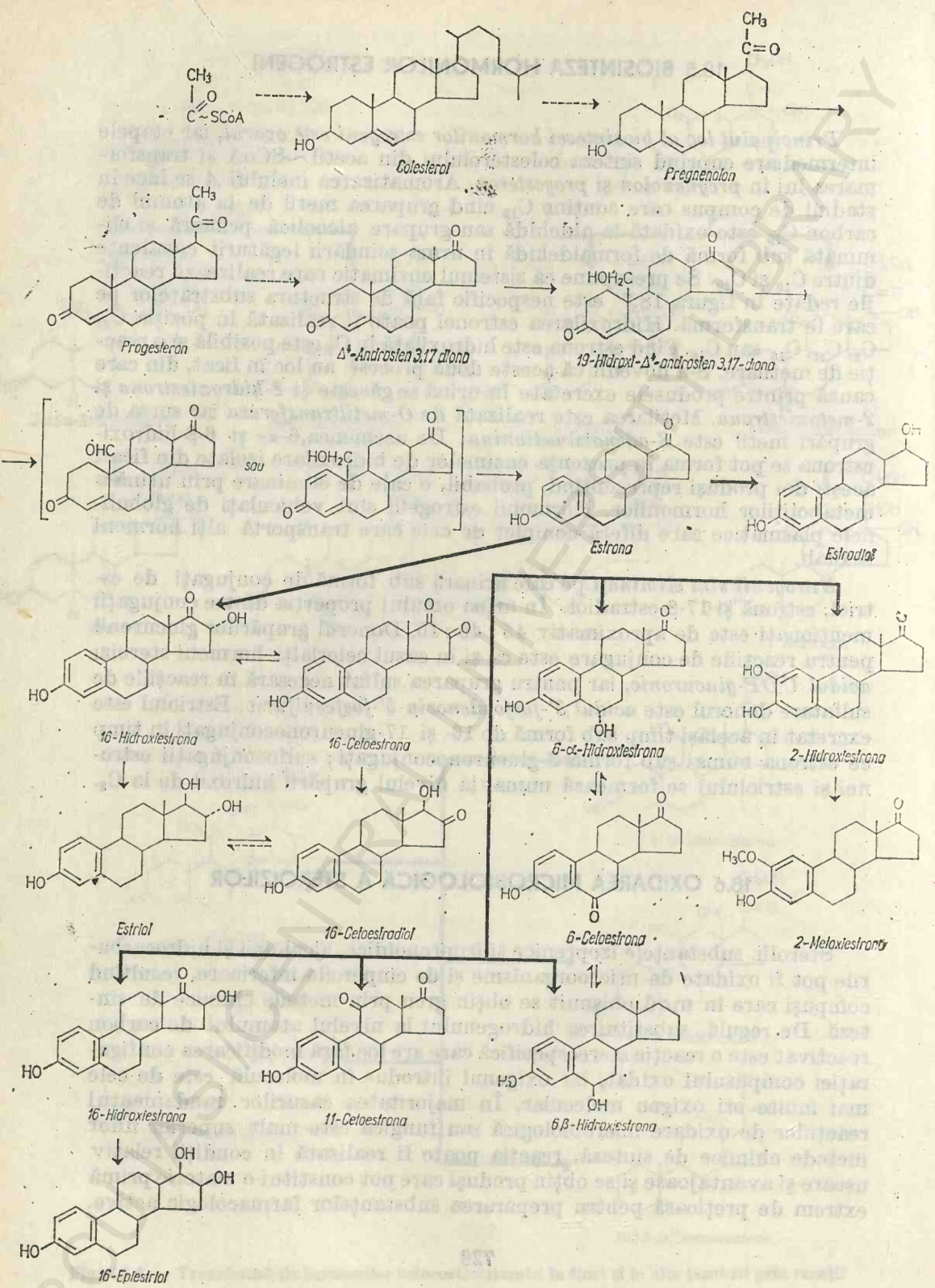
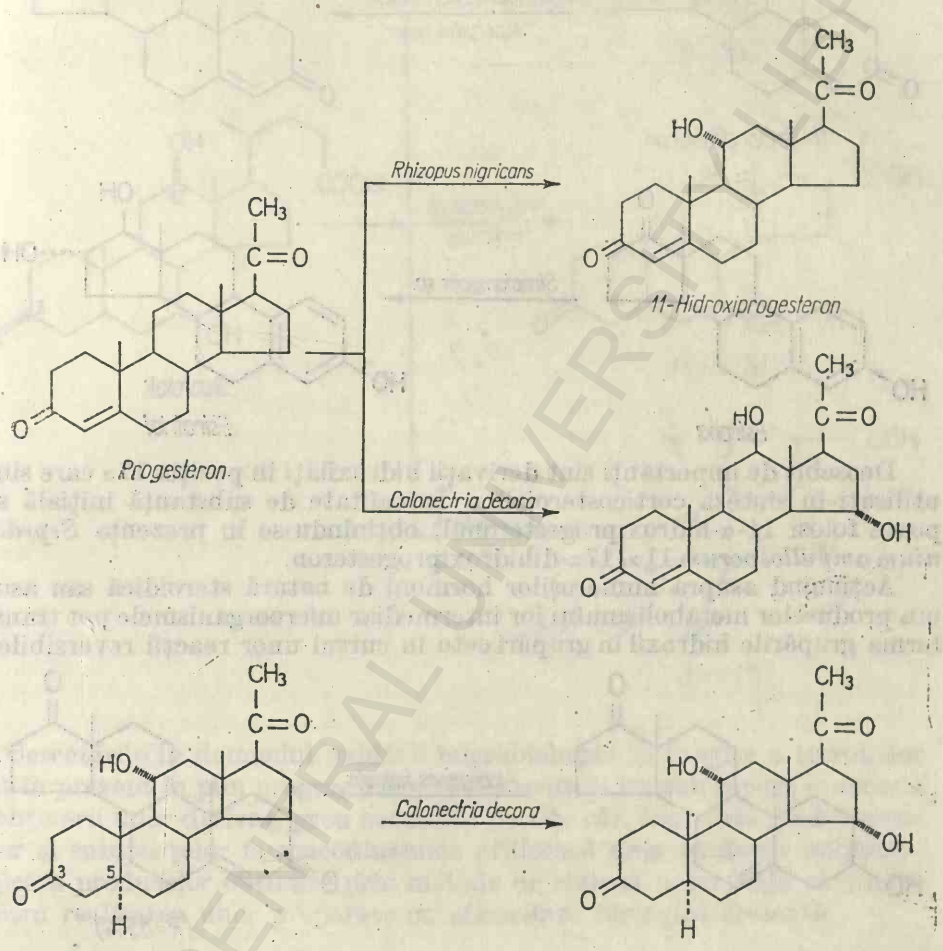


Fig. 18.7. — Geneza hormonilor sexuali feminini şi mecanismul aromatizării enzimatice a inelului *A* şi a hidroxilării estronei în C_2 C_6 C_{11} C_{16} şi C_{18}.

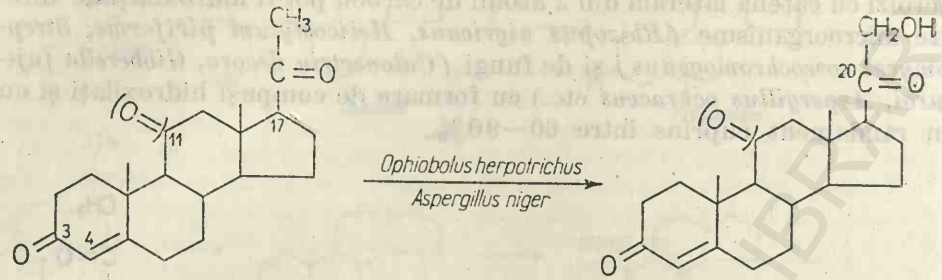
Progesteronul, norprogesteronul *A*, pregnandiona-3,20 și alți hormoni steroizi cu catenă laterală din 2 atomi de carbon pot fi hidroxilați de diferite microorganisme *(Rhizopus nigricans, Helicostylum piriforme, Streptomyces roseochromogenus)* și de fungi *(Calonectria decora, Gibberella fujikuroi, Aspergillus ochraceus* etc.) cu formare de compuși hidroxilați și cu un randament cuprins între 60—90%.



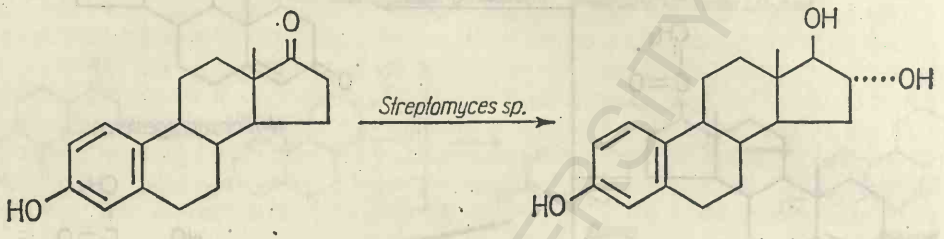
Reacțiile de oxidare se întîlnesc mai rar în cazul sterolilor. Unele specii ale genului *Mycobacterium* pot oxida colesterolul cu formare de colestanon și 27-hidroxicolesten-4-on-3. Hidroxilarea acizilor biliari de către microorganisme nu este cunoscută.

Microorganismele sînt capabile să oxideze hormonii steroizi și la nivelul atomului de carbon situat în vecinătatea grupării carbonil, cum este de

exemplu cazul 11-cetoprogesteronului și estronei :



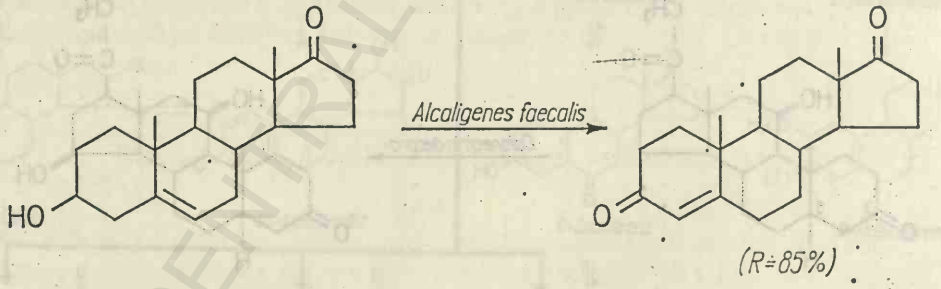
11-Cetoprogesteron

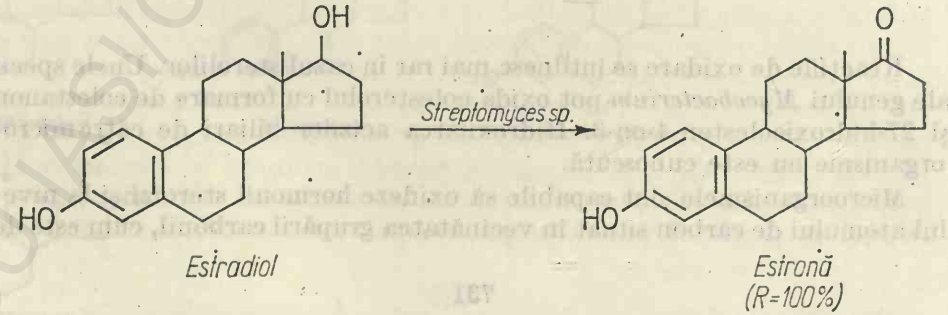


Estrona Estrafriol

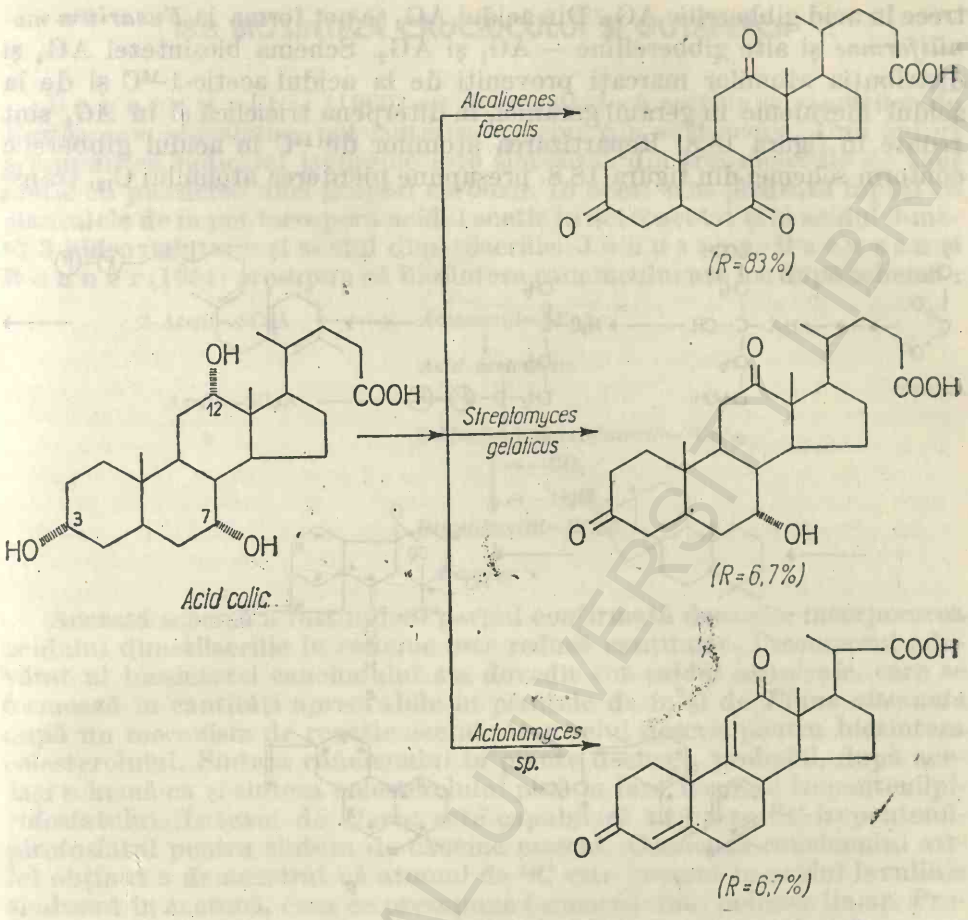
Deosebit de importanți sînt derivații hidroxilați în poziția 17α care sînt utilizați în sinteza corticosteroizilor. În calitate de substanță inițială se poate folosi 11-α-hidroxiprogesteronul, obținîndu-se în prezența *Sepedonium ampullosporum* 11α, 17α-dihidroxiprogesteron.

Acționînd asupra numeroșilor hormoni de natură steroidică sau asupra produselor metabolismului lor intermediar microorganismele pot transforma grupările hidroxil în grupări ceto în cursul unor reacții reversibile :





Estradiol Estronă (R=100%)



Cercetările în domeniul oxidării microbiologice și fungice a steroizilor sînt în prezent în plin progres datorită eficacității lor sub raport economic și obținerii unor derivați greu accesibili pe alte căi. Industria medicamentelor și substanțelor farmacodinamice utilizează deja oxidarea microbiologică a produselor obținute prin metode de sinteză industrială obișnuită pentru realizarea unor preparate cu eficacitate biologică crescută.

18.7 BIOSINTEZA GIBBERELLINELOR

Biosinteza gibberellinelor are ca punct de plecare acidul acetic și acidul mevalonic, substanțe larg folosite de plante pentru biosinteza sterolilor și terpenelor. C l e l a n d (1969) presupune că izopentenilpirofosfatul trece în geranil geraniol pirofosfat, iar acesta formează *caurenul,* care ulterior

trece în acid gibberellic AG_4. Din acidul AG_4 se pot forma la *Fusarium moniliformae* și alte gibberelline — AG_1 și AG_2. Schema biosintezei AG_4 și distribuția atomilor marcați proveniți de la acidul acetic-1-^{14}C și de la acidul mevalonic în geranil geraniol, în diterpena triciclică și în AG_4 sînt redate în figura 18.8. Repartizarea atomilor de ^{14}C în acidul gibberelic conform schemei din figura 18.8. presupune pierderea atomului C_{17}, trans-

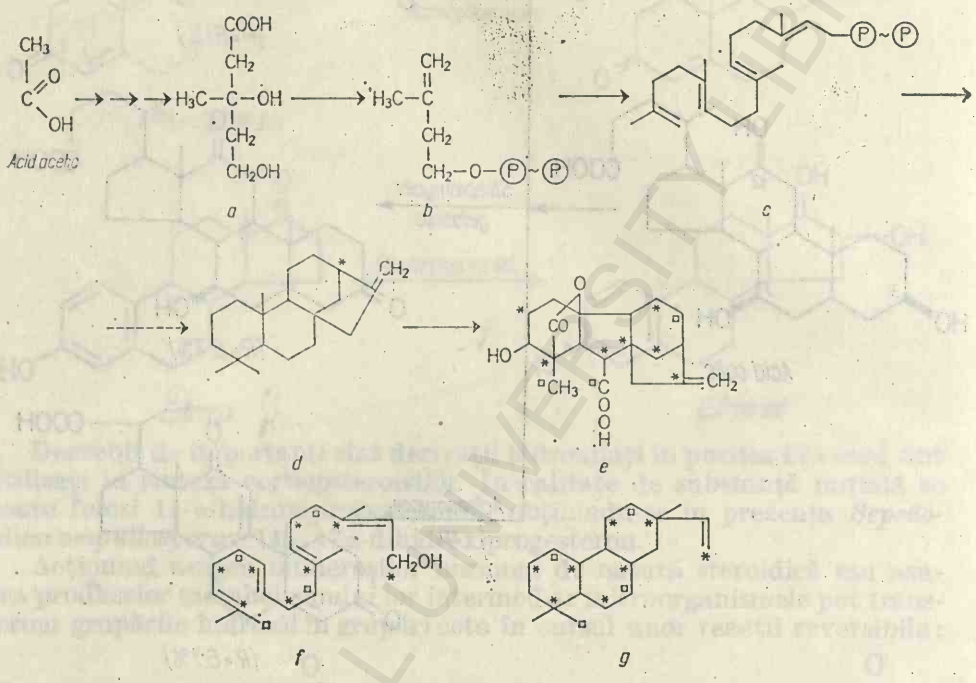
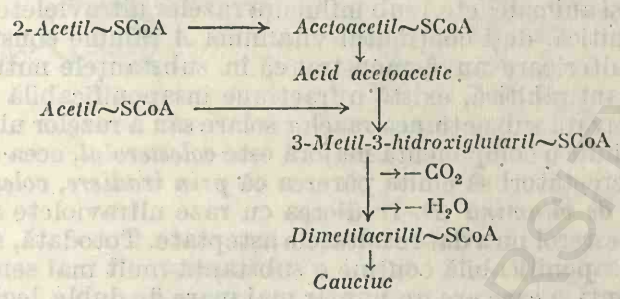


Fig. 18.8. — Biosinteza GA_4 la *Fusarium moniliforme* din acid mevalonic:
a; acid mevalonic, *b*; izopenteniIp rofosfat, *c*; geranilgeranil pirofosfat; *d*; *cauren*; *e*; GA_4 din care se pot forma ulterior GA_1 și GA (după datele lui C l e l a n d, 1969); *f*; repartizarea atomilor de ^{22}C proveniți din acidul acetic 1—^{22}C (×) și din acidul mevalonic ( ) în geranil geraniol și *g*; aceiași repartizare în diterpena triciclică care se formează din geran geraniol. Aceeași notație este valabilă și pentru atomii de carbon ai acidului gibberellic (*e*).

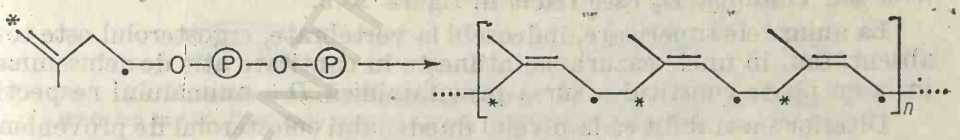
formarea inelului *B* într-um pentaciclu prin îndepărtarea atomului C_9 sub formă de dioxid de carbon, formarea din inelul C a unui nou inel cu o punte internă și o catenă laterală. Mecanismul enzimatic al acestor transformări este nestudiat. Utilizarea acidului mevalonic ca intermediar în biosinteza terpenelor a fost confirmată și în cazul acidului gibberellic sintetizat de *Gibberella fujikuroi*, de ramurile de *Pinus attenuata*, care sintetizează monoterpene, și de florile de *Salvia sclarea* care sintetizează *sclareolul*, o diterpenă biciclică. Dintre factorii care influențează procesul biosintezei gibberellinelor cei mai bine studiați sînt *lumina* și *temperatura*. B r i a n (1960) menționează că biosinteza gibberellinelor este influențată și de *fitocrom*, fiind dependentă de reacția fotoperiodică indusă de sistemul roșu/roșu închis.

18.8 BIOSINTEZA CAUCIUCULUI ŞI GUTAPERCII

B o n n e r şi a l ţ i i (1960) au demonstrat că secţiunile ramurilor de *Parthenium argentatum* pot sintetiza cauciuc din acid acetic. Unii autori presupun că radicalul izoprenic este sintetizat din trei molecule de acid acetic cu pierderea unei grupări carboxil. În acest sens pledează faptul că plantulele de in pot încorpora acidul acetic în acetoacetat şi în acidul 3-metil-3-hidroxiglutaric şi acidul dimetilacrilic. J o h n s t o n, R a c u s e n şi B o n n e r (1954) presupun că biosinteza cauciucului are loc după schema :



Această schemă a fost numai parţial confirmată deoarece incorporarea acidului dimetilacrilic în cauciuc este redusă cantitativ. Precursorul adevărat al biosintezei cauciucului s-a dovedit tot *acidul mevalonic*, care se formează în cantităţi apreciabile în plantele de in şi de *Pinus attenuata* după un mecanism de reacţie asemănător celui descris pentru biosinteza colesterolului. Sinteza cauciucului în plante decurge, probabil, după aceiaşi schemă ca şi sinteza colesterolului pînă în faza formării izopentenilpirofosfatului. Latexul de *Hevea* este capabil să utilizeze ^{14}C-izopentenilpirofosfatul pentru sinteza de cauciuc marcat. Ozonoliza cauciucului astfel obţinut a demonstrat că atomul de ^{14}C este prezent în acidul levulinic şi absent în acetonă, ceea ce presupune formarea unui polimer liniar. Procesul formării cauciucului şi distribuirea atomilor radioactivi ai izopentenilpirofosfatului pot fi redate schematic astfel :



În cazul latexului de *Hevea brasiliensis*, sinteza cauciucului se realizează din acid acetic şi acid mevalonic.

18.9 METABOLISMUL VITAMINELOR D

Una dintre cele mai cunoscute şi mai răspîndite boli de copii a fost rahitismul, maladie cronică ce se manifestă prin perturbarea depunerii normale a calciului şi a sărurilor de calciu în ţesutul osos în creştere. Rahi-

tismul este răspîndit și în prezent în unele țări slab dezvoltate din punct de vedere industrial, în care greutățile întîmpinate în asigurarea unei alimentații raționale a populației nu au fost încă rezolvate sau în care condițiile de locuit sînt necorespunzătoare.

Prima descriere detaliată a simptomelor de rahitism se situează în jurul anului 1650. Mult mai tîrziu, la începutul secolului al XX-lea, simptomele rahistismului au fost descrise amănunțit de Schmorl și Marfan. Steenbock și Funk au arătat că razele solare și ultravioletele au o acțiune binefăcătoare asupra organismelor bolnave de rahitism. Mai mult, numeroase produse alimentare (carnea, slănina, diferite uleiuri vegetale și animale etc.) sub influența razelor ultraviolete își măresc acțiunea antirahitică, deși conținutul vitaminei *A* rămîne constant.

Cercetările ulterioare au demonstrat că în substanțele nutritive care posedă acțiune antirahitică, există o fracțiune insaponificabilă a grăsimilor, care este activată sub acțiunea razelor solare sau a razelor ultraviolete. În această fracțiune o componentă majoră este *colesterolul*, ceea ce a determinat pe unii cercetători să emită părerea că *prin iradiere, colesterolul capătă proprietăți de vitamină D*. Iradierea cu raze ultraviolete a preparatelor pure de colesterol nu a dat rezultatele așteptate. Totodată, s-a stabilit că fracțiunea insaponificabilă conține o substanță mult mai sensibilă față de agenții oxidanți și care are un număr mai mare de duble legături decît colesterolul. Bazîndu-se pe aceste observații, Windaus cercetează acțiunea razelor ultraviolete și a luminii solare asupra ergosterolului.

Iradierea ergosterolului cu raze ultraviolete a dat un rezultat neașteptat: preparatele iradiate erau de 6 000 ori mai active decît fracțiunea insaponificabilă obținută din substanțele nutritive. Acest fapt a permis lui Windaus (1936, 1937) să formuleze ideea că *ergosterolul* este o *provitamină D*.

Din preparatele iradiate de ergosterol au fost separate două substanțe cu acțiune antirahitică și cu proprietăți fizico-chimice diferite, care ulterior au fost numite *vitaminele* D_1 și D_2. S-a stabilit însă că cele două substanțe reprezintă de fapt o singură vitamină — *vitamina* D_2 — care este impurificată cu produse secundare rezultate după iradierea preparatului cu raze ultraviolete. Mecanismul transformării ergosterolului în *ergocalciferol* sau vitamina D_2 este redat în figura 18.9.

La animalele superioare, îndeosebi la vertebrate, ergosterolul este total absent, sau, în unele cazuri, se întîlnește în cantitate atît de neînsemnată încît nu poate constitui o sursă provitaminică *D* a animalului respectiv.

Ulterior s-a stabilit că la nivelul duodenului colesterolul de proveniență alimentară este transformat cu ajutorul unei dehidraze în *7-dehidrocolesterol*, care pătrunde rapid în toate organele animalului și inclusiv în epidermă. Pe lîngă sursa exogenă de colesterol trebuie menționat și faptul că organismul animal este capabil să sintetizeze colesterolul, plecînd de la acidul acetic — un produs al metabolismului intermediar (v. pag. 717). În acest fel, conținutul și rezervele provitaminei *D* în derma animalelor și în epiderma omului nu sînt dependente de cantitatea de colesterol alimentar.

Din 7-dehidrocolesterolul prezent în epidermă, sub acțiunea radiațiilor *UV* se formează *colecalciferol* sau vitamina D_3, cea mai activă biologic din familia vitaminelor *D*. Alți steroli, 22-dihidroergosterolul, 7-dehidrositos-

terolul, 7-dehidrostigmasterolul sînt provitaminele D_4, D_5 și D_6. La șobolan vitamina D absorbită la nivelul intestinului este parțial esterificată și transportată în organism în limfă, iar la om vitamina D circulă sub formă legată cu α_2-globulinele și cu albuminele.

D e L u c a și c o l a b. (1957, *a*, *b*) au utilizat vitamina D_3 marcată cu izotopi radioactivi și au observat că în organism aceasta este transformată

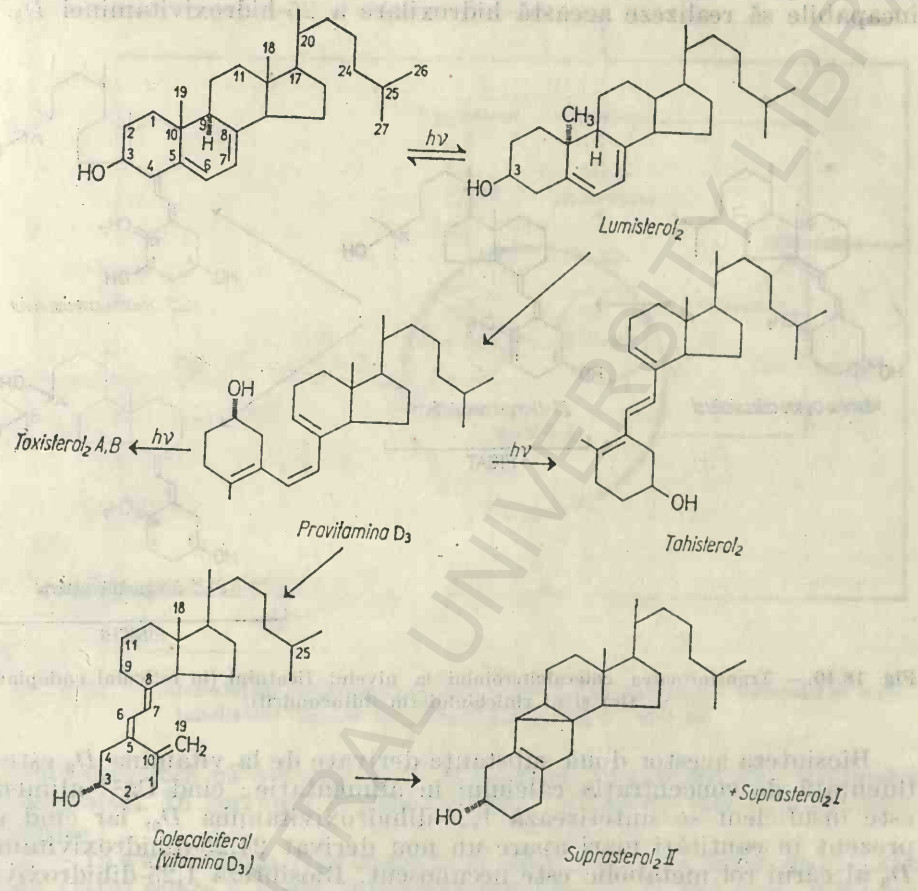


Fig. 18.9. — Fotoizomerizarea ergosterolului și obținerea ergocalciferolului prin iradierea în UV. Produsele rezultate după iradiere au fost separate prin metoda gaz-cromatografiei lichide.

într-o substanță mai polară, cu un grad de solubilitate în grăsimi mai mic, care stimulează *în vivo* transportul Ca^{2+} prin membrana intestinală, mult mai rapid decît vitamina D_3. Această substanță a fost identificată cu 25-hidroxivitamina D_3 (fig. 18.10). Hidroxilarea vitaminei D_3 are loc în reticulul endoplasmatic al celulelor hepatice și necesită prezența oxigenului molecular. 25-Hidroxivitamina D_3 a fost sintetizată în laborator, marcată cu izotopi radioactivi și administrată intravenos animalelor de experiență. Din intestinul subțire și din rinichii de pui de găină H o l i c k, D e L u c a și a l ț i i (1971) au izolat un nou derivat al vitaminei D_3 — 1,25-dihidro-

xivitamina D_3 — mult mai activ decît toate vitaminele (de 100 ori mai activ decît 25-hidroxivitamina D_3) atît asupra țesutului osos cît și asupra metabolismului calciului.

K o d i c e k și a l ț i i (1970) au arătat că 25-hidroxivitamina D_3 este transformată la nivelul mitocondriilor renale și în prezența oxigenului molecular în 1,25-dihidroxivitamina D_3. Animalele cu renalectomie totală sînt incapabile să realizeze această hidroxilare a 25-hidroxivitaminei D_3.

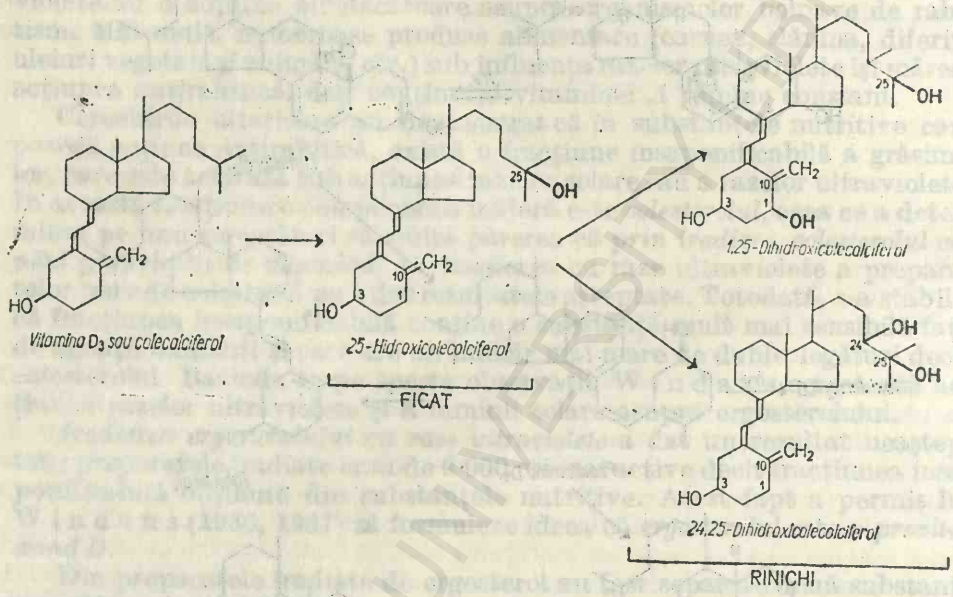


Fig. 18.10. — Transformarea colecalciferolului la nivelul ficatului (în reticulul endoplasmatic) și al rinichiului (în mitocondrii).

Biosinteza acestor două substanțe derivate de la vitamina D_3 este influențată de concentrația calciului în alimentație: cînd Ca^{2+} alimentar este insuficient se sintetizează 1,25-dihidroxivitamina D_3, iar cînd este prezent în cantități mari apare un nou derivat 24,25-dihidroxivitamina D_3 al cărui rol metabolic este necunoscut. Biosinteza 1,25-dihidroxivitaminei D_3 este inhibată și de paratiroidectomia totală, deci în lipsa parathormonului care controlează nivelul calcemiei și diureza renală a fosfaților.

În 1973 H o l i c k, D e L u c a și c o l a b. au arătat că anionul PO_4^{3-} modifică, de asemenea, biosinteza 1,25-dihidroxivitaminei D_3: la concentrații mici stimulează biosinteza, fără intervenția parathormonului, determinînd în același timp o absorbție sporită a fosfaților la nivelul intestinului. În figura 18.11 sînt redate mecanismele de control și reglare a biosintezei diferiților derivați ai vitaminei D_3.

Bazîndu-se pe descoperirile sale D e L u c a propune ca vitamina D să fie clasificată drept o substanță prohormonală, iar derivații ei activi drept hormoni. Această opinie nu este încă recunoscută în rîndul specialiștilor, dar cercetările de mai sus au modificat conceptual tratamentul unor forme de rahitism rezistente la administrarea de vitamină D.

Steenbock și Bellin (1953) au demonstrat în experiențele efectuate pe șobolani, că vitaminele *D* cauzează o creștere a concentrației de citrat în mai multe organe și țesuturi : intestin subțire, sînge, țesut osos, inimă, rinichi, însă nu la nivelul ficatului. Creșterea citratului în aceste organe și țesuturi este asociată cu o eliminare a citratului în urină, în concentrații mai mari decît cele fiziologice.

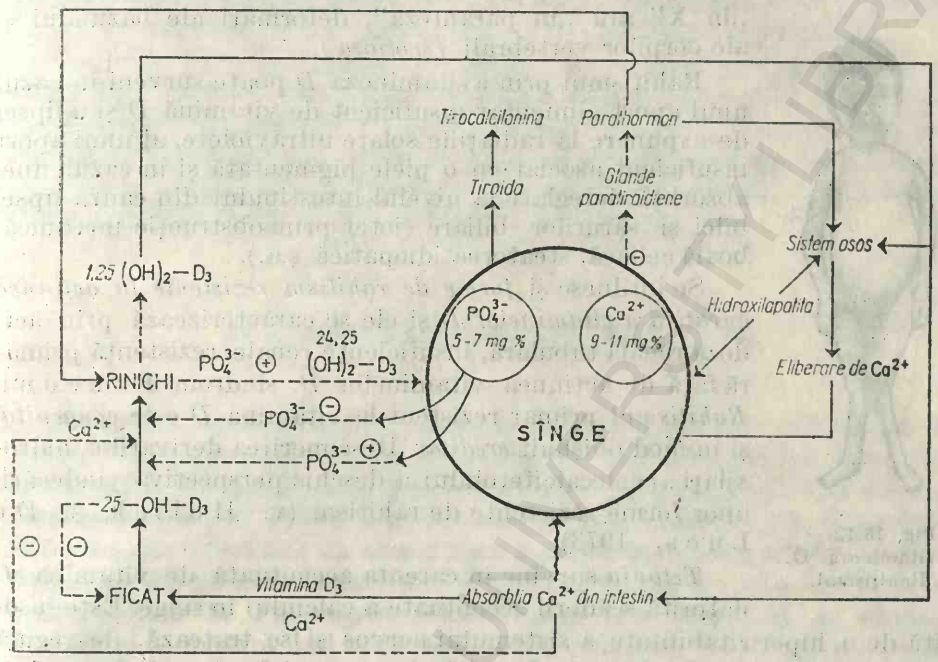


Fig. 18.11. — Interrelațiile dintre factorii care participă la menținerea calcemiei și metabolismul colecalciferolului în organismul animal.

Cert este însă că vitaminele *D* influențează metabolismul fosfocalcic din organism. În sprijinul acestei afirmații categorice pledează următoarele fapte :

1. — În avitaminoza *D* la sugari și la copii mici (pînă în cel de al doilea an de viață) apare o boală cunoscută sub numele de *rahitism*, tulburare gravă a procesului de mineralizare a oaselor în creștere, matricea osoasă rămînînd necalcifiată.

2. — Calcifierea defectuoasă a matricei osoase la adulți dă naștere bolii denumită *osteomalacie*, caracterizată prin deformări osoase, difuz prezentă în tot scheletul, cu o dezvoltare lentă și generalizată și însoțită de fracturi și tetanie.

3. — *Osteoporoza* este tot o dereglare a procesului de osificare la adulți, oasele prezentînd pori și devenind ușor friabile.

4. — Concentrația fosforului seric scade în carența de vitamină *D* de la 5 mg % la 2—3 mg %, în timp ce calcemia este, de asemenea, micșorată (9—11 mg % în stare normală ; 7 mg % și chiar 5 mg % în stările de tetanie).

Rahitismul este o maladie frecventă în țările subdezvoltate, în care copiii sînt crescuți în condiții neigienice (locuințe întunecoase, insalubre). Deformările scheletului devin evidente pe măsură ce copiii cresc : la 6 luni *craniotasul*, ulterior, hipertrofia joncțiunii condro-costale *(mătănii rahitice)*, *distensie abdominală* (fig. 18.12) avînd drept urmare relaxarea mușchilor abdominali și apariția unui abdomen voluminos, membre inferioare „în X" sau „în paranteză", deformări ale bazinului și ale corpilor vertebrali *(scolioza)*.

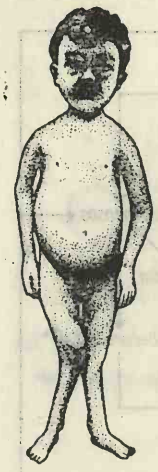


Fig. 18.12. — Avitaminoza D. Rahitismul.

Rahitismul prin avitaminoza *D* poate surveni în cazul unui aport alimentar insuficient de vitamină *D* și a lipsei de expunere la radiațiile solare ultraviolete, al unui aport insuficient asociat cu o piele pigmentată și în cazul unei absorbții dereglate la nivelul intestinului din cauza lipsei bilei și sărurilor biliare (icter prin obstrucție mecanică, boală celiacă, steatoree idiopatică ș.a.).

Se întîlnesc și *forme de rahitism rezistente la acțiunea curativă a vitaminelor D* și ele se caracterizează prin acidoză renală tubulară, insuficiențe renale, rezistență primară față de acțiunea vitaminelor *D*, sindrom F a n c o n i. *Rahitismul* primar rezistent la vitamina *D* este *congenital* și în mod obișnuit *ereditar*. Descoperirea derivaților hidroxilați ai colecalciferolului a deschis perspectiva vindecării unor forme rezistente de rahitism (v. H o l i c k și D e L u c a, 1973).

Tetania survine în carența accentuată de vitamina *D* datorită scăderii accentuate a calciului în sînge. Este însoțită de o hiperiritabilitate a sistemului nervos și se tratează, de regulă prin administrarea de gluconat de calciu (mai rar și de clorură de calciu).

Osteomalacia și *osteoporoza* survin la adulți ca urmare a dereglării absorbției intestinale a calciului, în tulburările absorbției lipidelor, cînd calciul este eliminat în fecale sub forma unor săruri insolubile. Boala poate fi și o consecință a unei disfuncții renale.

Alte simptome asociate strîns cu rolul fiziologic al vitaminelor *D* sînt determinate genetic și se moștenesc (exemplu, sindromul F a n c o n i, care se manifestă prin depunerea de cistină în țesuturi sau defecte de absorbție a fosfaților la nivelul rinichilor).

Avitaminoza *D* a fost studiată îndeosebi la om, însă a fost reprodusă experimental la animalele de laborator (șobolani albi), precum și la păsări (pui de găină).

Necesități fiziologice. Surse de vitamine D. *Sursa alimentară* cea mai bogată în vitamină *D* o constituie *ficatul de pește sau ficatul animalelor care se hrănesc cu pește. Ficatul de morun* este deosebit de bogat în această vitamină. Conținutul în vitamine *D* al unor surse naturale este îmbogățit artificial prin iradiere cu raze ultraviolete (de exemplu, margarina, laptele).

Copiii şi femeile gravide au nevoie zilnic de 400 U.I., o unitate internaţională de vitamină *D* fiind definită drept cantitatea de vitamină care echivalează ca activitate biologică cu 0,025 μg de colecalciferol cristalizat.

Ingerarea unor cantităţi mari de vitamină *D* o perioadă de timp mai îndelungată, determină apariţia unei reacţii de intoxicare şi o calcifiere intensă a ţesuturilor moi, uneori chiar şi a rinichilor şi plăminilor.

Excesul de vitamine D este toxic pentru om în cazul cînd aportul cotidian depăşeşte 1 000 — 3 000 UI/kg corp în decurs de cîteva luni, iar manifestările clinice sînt variate şi discrete (lipsă de apetit, tulburări gastro-intestinale, dureri de cap, moliciune în membre şi articulaţii). Acţiunea vitaminelor *D* asupra metabolismului calciului şi interrelaţiile lor cu factorii de natură hormonală sînt descrise în capitolul 23.

18.10 METABOLISMUL CAROTENOIZILOR

Structura de bază a celor mai tipici carotenoizi este constituită din catene izoprenice, care conţin 40 de atomi de carbon. Cei mai importanţi carotenoizi, din punct de vedere biochimic şi biologic, sînt cei a căror catenă polienică este ciclizată la una sau ambele ei extremităţi. Majoritatea experienţelor efectuate cu scopul de a descifra biogeneza carotenoizilor au fost realizate pe microorganisme, ciuperci şi fructe de tomate. Biosinteza carotenoizilor la *Phycomyces blakesleeanus* este stimulată de maltoză, glucoză şi în măsură mai mică de xiloză şi fructoză. Glicerolul şi substanţele asemănătoare lui ca structură şi proprietăţi, de asemenea, determină accelerarea biosintezei carotenoizilor.

S-a demonstrat că *Phycomyces blakesleeanus* cultivat pe medii care conţineau acetat — ^{14}C sintetizează un caroten, în care 70% din atomii de carbon provin de la acetatul radioactiv. În experienţele efectuate cu *Mucor hiemalis*, cultivat pe medii de cultură care conţineau, în calitate de unică sursă de carbon $^{14}CH_3COOH$ sau $CH_3—^{14}COOH$ s-a demonstrat că aproximativ 90% din carotenoizii sintetizaţi se găsesc sub formă de β-caroten. Studiul repartizării trasorului radioactiv în molecula β-carotenului, realizat după separarea acestuia a arătat că atît ^{14}C provenit din gruparea metil, cît şi ^{14}C al grupării carboxil ale acetatului sînt utilizaţi în procesul de biosinteză a carotenului. Provenienţa diferiţilor atomi de carbon ai β-carotenului sintetizat de *Mucor hiemalis*, cultivat pe medii care conţineau acetat radioactiv, este redată în figura 18.13.

Goodwin şi Lijinsky studiind creşterea forţată a lui *Phycomyces* pe medii care conţineau ca unice surse de carbon una din următoarele substanţe — valina, leucina, aldehida β-metilcrotonică, aldehida izovalerianică, acidul 2-hidroxiizocapronic, 2-cetoizocaproic, acid β-metilcrotonic — au arătat că numai unele dintre aceste substanţe pot servi ca precursori

în biosinteza carotenoizilor. Autorii ajung la concluzia că unitatea izoprenică cea mai probabilă, care participă la biosinteza carotenoizilor este *aldehida β-metilcrotonică*, produs al degradării leucinei și valinei.

Numeroși cercetători au arătat că *β-hidroxi-β-metilglutaril*—CoA se poate transforma în acid mevalonic în sistemele capabile să sintetizeze steride și carotenoizi. Se consideră că acidul mevalonic constituie o etapă

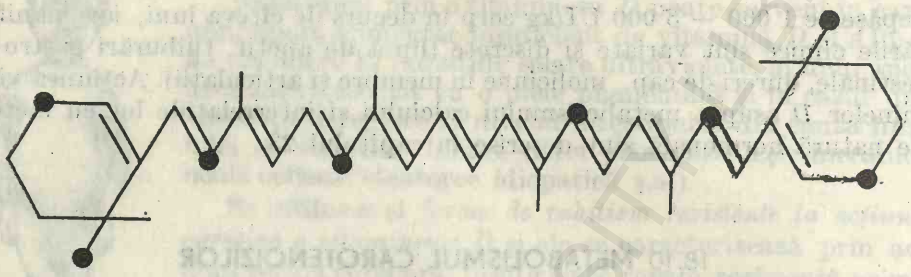


Fig. 18.13. — Repartizarea atomilor de ^{14}C din moleculele de acid acetic radioactiv în molecula de β-caroten.

importantă și el este încorporat în carotenul sintetizat de *Phycomyces* și de *Mucor hiemalis*, precum și în licopina separată din tomate. Utilizarea acidului mevalonic pentru această biosinteză este de cîteva ori mai intensă în comparație cu folosirea acetatului și β-hidroxi-β-metilglutaratului în aceleași scopuri, ceea ce demonstrează că acest acid este un produs intermediar în biosinteza carotenilor. În figura 18.14 sînt notați atomii de car-

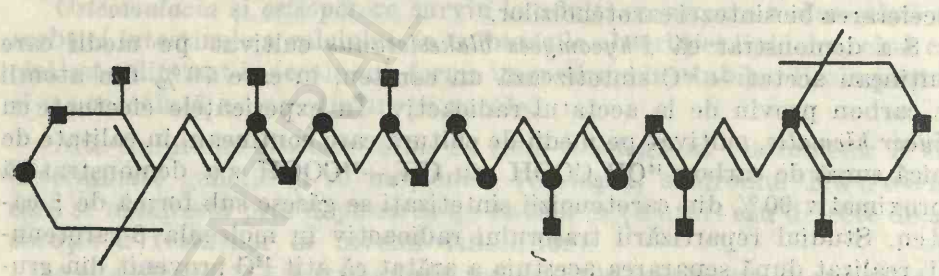


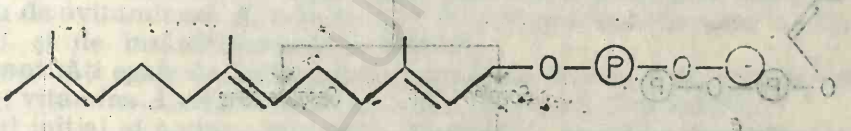
Fig. 18.14. — Incorporarea în molecula de β-caroten, sintetizat de *Phycomyces* a doi ^{14}C din molecula acidului mevalonic.
● — carbonul $^{14}COOH$
■ — carbonul $^{14}CH_3$

bon ai β-carotenului care provin din atomii de carbon radioactivi ai acidului mevalonic.

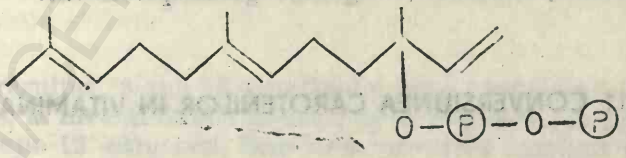
Acidul mevalonic este utilizat în sinteza carotenoizilor după fosforilarea lui prealabilă. În prima etapă a fosforilării se formează *acidul 5-fosforil-*

mevalonic iar după etapa secundă — *acidul 5-pirofosforilmevalonic*. Ambele etape ale fosforilării necesită prezența și utilizarea acidului adenozintrifosforic. Acidul 5-pirofosforilmevalonic este ulterior decarboxilat cu formare de β-izopentenilpirofosfat, precursorul carotenoizilor. Recent s-a demonstrat că 1-^{14}C-izopentenilpirofosfatul în prezența extractelor enzimatice, obținute din levuri și în omogenatele de tomate, este incorporat în β-caroten, cu o viteză mult mai mare decît acidul 2-^{14}C-mevalonic. Pînă la stadiul de utilizare a acidului mevalonic și de formare a izopentenilpirofosfatului procesul biosintezei carotenilor este asemănător cu biosinteza sterolilor. Relativ recent s-a demonstrat că iodacetamida, inhibitorul izopentenilizomerazei, blochează încorporarea acidului mevalonic în carotenoizi, ceea ce confirmă încă o dată asemănarea dintre cele două procese de biosinteză. Deosebirea esențială dintre cele două căi de utilizare a acidului mevalonic în organism (în sinteza carotenoizilor și steridelor) constă în aceea că transformarea acestuia în scvalen este un proces de reducere, în timp ce utilizarea lui în sinteza carotenoizilor pledează în favoarea existenței unui proces de oxidare.

Izopentenilpirofosfatul izomerizează cu formare de *dimetilalilpirofosfat*, iar acești doi izomeri prin condensare dau naștere *geranilpirofosfatului*, care la rîndul lui alchilează o moleculă de izopentenilpirofosfat cu formare de *farnezilpirofosfat*. Acest produs prin alchilarea unei noi unități de izopentenilpirofosfat dă *geranil geranil pirofosfat*:

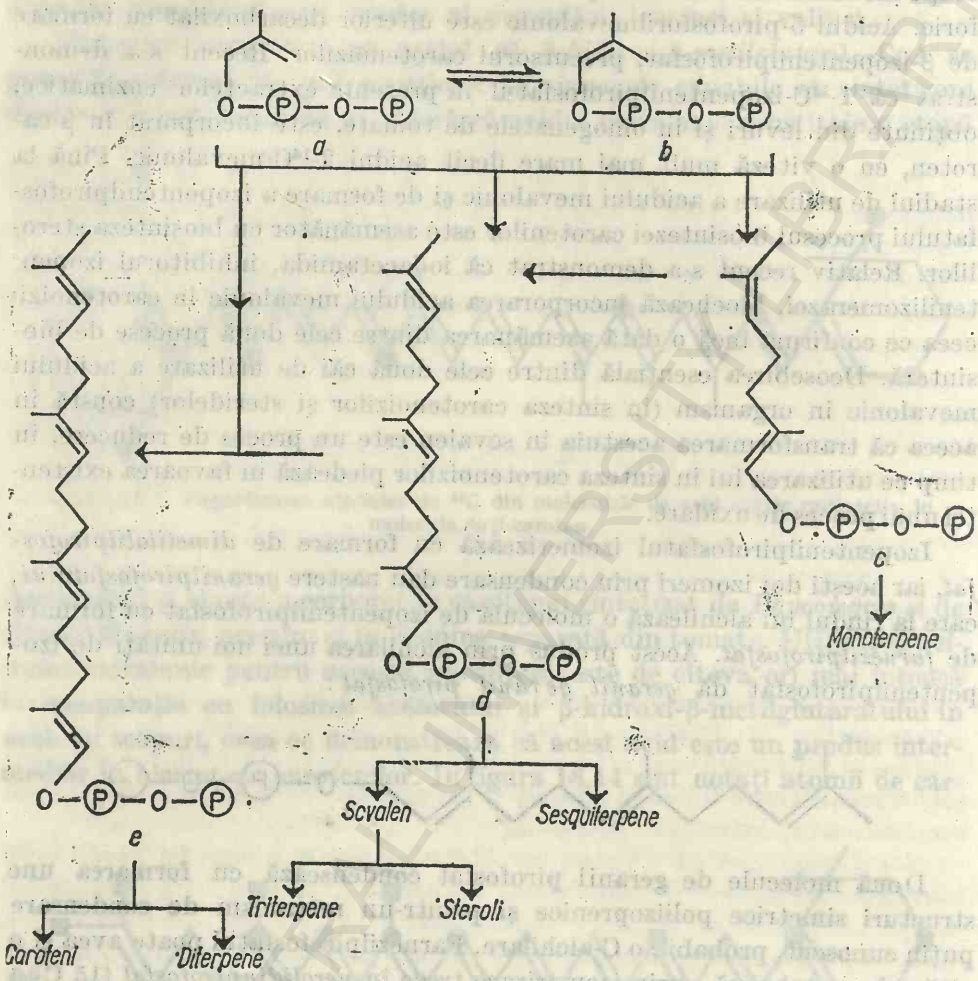


Două molecule de geranil pirofosfat condensează cu formarea unei structuri simetrice poliizoprenice și printr-un mecanism de condensare puțin cunoscut, probabil, o C-alchilare. Farnezilpirofosfatul poate avea și o altă cale metabolică : prin izomerizare trece în *nerolidinpirofosfat* (15 C) a cărui grupare metilen terminală este deosebit de reactivă și poate alchila o



nouă moleculă de farnezilpirofosfat după tipul „coadă la coadă" formînd legături specifice pentru terpene și steroizi. O reacție similară în care produsul inițial folosit în procesul de condensare este geranil geranil pirofosfatul duce la formarea precursorului carotenoizilor.

Schematic procesul final al formării terpenelor și înrudirea lor genetică pot fi redate astfel :



în care *a* este izopentenilpirofosfat ; *b* dimetilalilpirofosfat ; *c* geranilpirofosfat ; *d* farnezil pirofosfat și *e* geranil geranilpirofosfat.

18.11 CONVERSIUNEA CAROTENILOR ÎN VITAMINA A

Dacă hrana mamiferelor, păsărilor și crustaceilor nu conține vitamina *A*, acestea o pot sintetiza *in vivo* din provitaminele *A*, biologic active. În ceea ce privește peștii, se crede că ei primesc vitamina *A* în formă definitivă din crustaceele cu care se hrănesc. Acest punct de vedere este încă discutabil.

Moore (1930) a fost primul cercetător care a demonstrat transformarea β-carotenului în vitamina *A*, ulterior depozitată în ficat. Mai tîrziu, Karrer, Kuhn și colaboratorii lor au stabilit legătura genetică dintre structura acestor compuși izoprenici și activitatea biologică a vitaminei A.

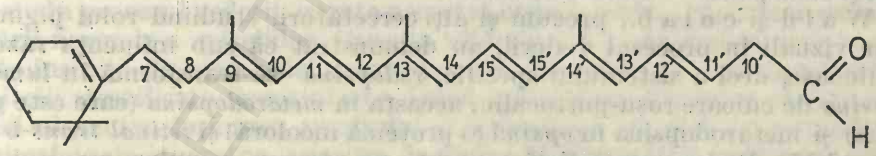
β-Carotenul posedă o activitate vitaminică de două ori mai mare decît α, γ-carotenii și criptoxantina. El este transformat, după părerea unor autori, în vitamină *A* prin scindare hidrolitică. După teoria fizico-chimică formulată de Zechmeister, carotenii sînt oxidați catalitic cu formarea aldehidei vitaminei *A*. Aceasta trece ulterior, relativ ușor, în forma alcoolică a vitaminei *A* denumită *retinol*. Un asemenea mod de scindare oxidativă a carotenilor nu contravine activității biologice a carotenilor, care este diferită. Se presupune că scindarea oxidativă se realizează la una din extremitățile moleculei de caroten. Indiferent de extremitatea de la care se va efectua oxidarea moleculei β-carotenului, întotdeauna se va forma o singură moleculă de vitamină *A*. În cazul carotenilor cu un singur ciclu β-ononic (α- și γ-carotenul), scindarea oxidativă poate avea ca rezultat sau formarea unei molecule de vitamină *A* sau a unui produs inactiv. Această situație explică activitatea biologică scăzută a α și γ-carotenului. În concordanță cu teoria probabilităților, molecula α-carotenului poate fi scindată oxidativ sau cu formare de vitamină *A* sau cu apariția unui produs inactiv, caracterizat prin prezența, la una din extremitățile sale, a ciclului α-ononic. Un astfel de mecanism de scindare oxidativă a carotenilor este confirmat de diferite fapte experimentale:

— din intestinul cabalinelor au fost separate și identificate cromatografic, produsele intermediare β-apo-8′; β-apo-10′ și β-apo-12′-*carotinalii*;

— introducerea acestor carotinali în organismul șobolanilor albi, care sufereau de avitaminoză *A*, este însoțită de o rapidă transformare în vitamină *A* și de însănătoșirea animalelor;

— cantități egale de β-caroten și vitamina *A* au o activitate biologică diferită: vitamina *A* este de două ori mai activă decît β-carotenul.

Locul inițial al acțiunii enzimei se situează în molecula β-carotenului la nivelul dublelor legături laterale care se găsesc în vecinătatea ciclului ononic, formîndu-se un produs intermediar β-apo-10′-carotinalul:



Produsul rezultat, β-apo-10′-carotinalul, este supus din nou unei scindări oxidative, la nivelul dublei legături de la extremitatea neciclizată, cu formare de β-apo-12′-carotinal. Scindarea succesivă continuă pînă la obținerea vitaminei *A* sub formă de aldehidă. Aldehida vitaminei *A* posedă o grupare metil în poziția β față de carbonil, spre deosebire de carotinali, care aveau gruparea $-CH_3$ în poziția α, ceea ce face imposibilă o nouă oxidare și determină reducerea la vitamina *A* (forma alcoolică).

α-și γ-carotenii, în calitate de precursori ai vitaminei *A* au deci o activitate de două ori mai mică în comparație cu activitatea vitaminică a

β-carotenului, iar licopina este total inactivă. γ-izomerul carotenului este de patru ori mai puțin activ decît β-izomerul, deoarece prezența unei grupări pseudoiononice diminuează activitatea imprimată de ciclul β-ononic; δ-izomerul este aproximativ total inactiv biologic, deoarece este complet lipsit de ciclul β-ononic.

Un alt factor deosebit de important pentru activitatea vitaminică a carotenilor este izomeria lor spațială. În natură, carotenii se întîlnesc, de regulă, sub formă de *trans*-izomeri. S-a demonstrat că *cis*-izomerii α-și β-carotenilor au o activitate vitaminică mai scăzută decît izomerii omologi *trans*. Se presupune că, în procesul de transformare (*trans-cis*-izomerizare) molecula carotenului își pierde forma ei inițială, ceea ce constituie un impediment pentru acțiunea sistemului (sau sistemelor) enzimatic, care participă la transformarea carotenului respectiv în vitamina A.

Rolul fiziologic al vitaminelor A. Carența vitaminei *A* în alimentație determină starea de avitaminoză *A*, caracterizată prin numeroase simptome. La animalele de laborator, de exemplu la șobolanii albi, avitaminoza *A* se manifestă printre altele și prin stagnarea creșterii în greutate. Din această cauză vitamina *A* a fost numită și *vitamina creșterii*. Denumirea aceasta este însă inadecvată, deoarece stagnarea creșterii animalelor de laborator nu este un simptom caracteristic numai avitaminozei *A*, fenomenul întîlnindu-se și în cazul altor avitaminoze sau în situația unei alimentații a cărei valoare nutritivă este scăzută sau este săracă în proteine etc. *Simptomul cel mai caracteristic pentru avitaminoza A este perturbarea capacității de adaptare a ochiului la lumina crepusculară.*

Pentru ca lumina să excite sistemul nervos și la nivelul ochiului să se formeze imagini, este necesar ca aceasta să fie absorbită. Conurile și bastonașele prezente în retină conțin substanțe absorbante — *pigmenții vizuali* — care sub influența fasciculului luminos suferă unele transformări chimice specifice. În prezent, se cunosc patru pigmenți vizuali: *rodopsina* la vertebratele acvatice și terestre, și *porfiropsina* la peștii de apă dulce, localizați în bastonașe și *iodopsina* la vertebratele terestre și *cianopsina*, situate în celulele în formă de conuri. Fiecare tip de pigment vizual prezent în celulele fotoreceptoare este alcătuit dintr-o proteină *(opsina)* și o grupare prostetică care în rodopsină și iodopsină este *retinalul*, iar în porfiropsină și cianopsină — *dehidroretinalul*.

W a l d și c o l a b., precum și alți cercetători, studiind rolul pigmenților vizuali în procesul vederii, au demonstrat că sub influența razelor luminoase, deci a sistemului specific, *rodopsina* se transformă în *lumirodopsina* de culoare roșu-portocaliu, aceasta în *metarodopsina* (care este galbenă) și metarodopsina în *opsină* (o proteină incoloră) și *retinal trans-trans* (fig. 17.15). Rodopsina inițială care este un compus complex, rezultat din interacțiunea dintre opsină și retinen, conține două duble legături *cis*, în timp ce retinenul rezultat după descompunerea rodopsinei sub influența luminii are o configurație *trans*. *Această transformare este ireversibilă*. Reducerea retinalului *trans* la *retinol* are loc în configurația *trans*, după care alcoolul părăsește sfera retinei. Transformarea retinalului în vitamină *A* se realizează în prezența retinenreductazei, care conține în calitate de coenzimă NADH. Pentru refacerea rodopsinei este necesară oxidarea vitaminei A-11-*cis*, prezentă în sîngele care irigă retina în retinal-11-*cis*. Acest ultim compus reacționează cu opsina, la întuneric, refăcînd astfel rodop-

sina. Diferențele de potențial induse în cursul acestei izomerizări explică cum impresiile vizuale percepute cu ajutorul celulelor în formă de conuri și bastonașe sînt înregistrate și decodificate de creier.

D o w l i n g și W a l d au constatat că retinenul estei mplicat nu numai în profilaxia stărilor de hemeralopie, ci și în stabilizarea opsinei și în preîntîmpinarea distrugerii celulelor în formă de bastonașe, prezente în retină.

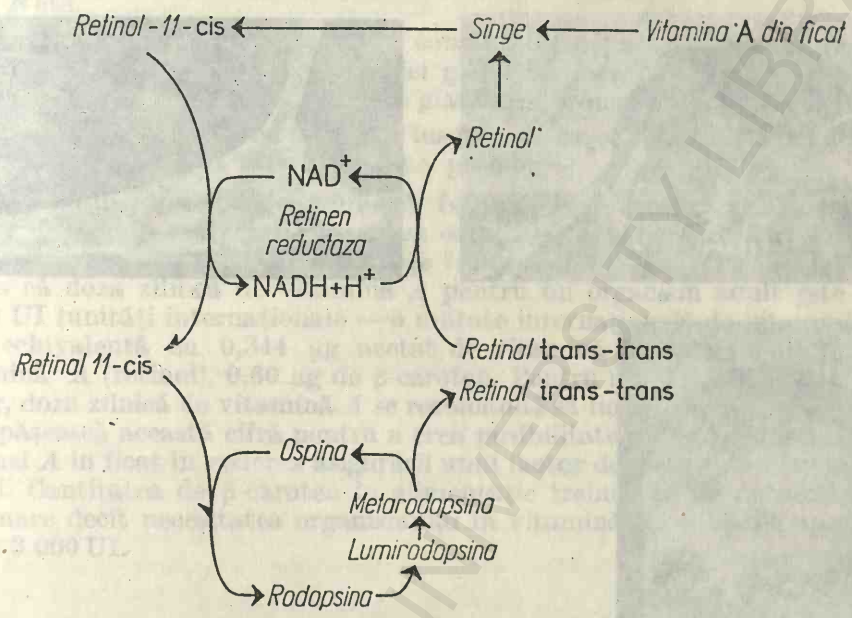


Fig 18.14 — Schema ciclului vizual.

Aceste fapte experimentale vin să dovedească necesitatea prezenței în alimentația zilnică a unei anumite cantități de vitamină *A*, care trebuie să compenseze pierderile sau mai bine zis „consumul" efectuat la nivelul aparatului vizual.

În afară de rolul deosebit de important pe care vitamina *A* îl îndeplinește în procesul vederii, ea este necesară organismului și pentru menținerea stării normale a epiteliilor. Carența vitaminei *A* la animalele de laborator este însoțită de modificări progresive ale epiteliilor, care se transformă în epitelii stratificate, keratinizate. După unii autori, vitamina *A* este necesară și pentru formarea smalțului și a dentinei, iar alții au semnalat, la animalele de laborator, apariția de anomalii congenitale la urmași, scăderea fertilității și degenerarea organelor de reproducere.

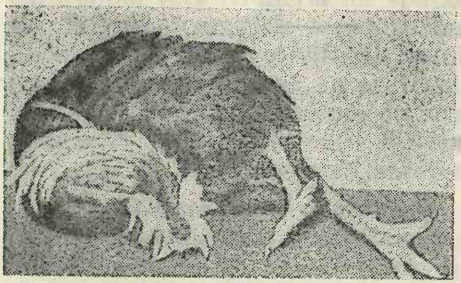
La om carența de vitamină A se manifestă prin mai multe semne clinice, care, după gravitatea lor, au fost denumite *hemeralopie*, *xeroftalmie* și *keratomalacie* (fig. 18.15).

Hemeralopie, sau orbul găinilor, constituie, probabil, primul semn clinic al carenței de vitamină *A*, care se manifestă prin aceea că bolnavii nu mai sînt capabili să se orienteze după căderea întunericului sau la lumina crepusculară. Această fază incipientă a avitaminozei *A* este dificil de diagnosticat, îndeosebi la sugari și la copiii mici și ea poate fi ușor vindecată prin

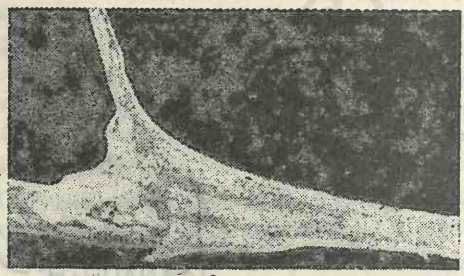
administrarea unor alimente bogate în caroteni. Hipocrat, vestitul medic grec, care cunoștea hemeralopia, recomanda bolnavilor să consume ficat proaspăt.

Cauza hemeralopiei poate fi nu numai avitaminoza A.

Dacă avitaminoza *A* este accentuată sau de durată lungă, edemului retinian îi urmează modificări degenerative mai mult sau mai puțin grave :



a



b

c

Fig. 18.15. — Avitaminoza *A* la animale și la om :

a. — avitaminoza *A* la puii de găină se manifestă după primele 20 zile prin incapacitatea de a se menține în poziție verticală, prin apetit scăzut și moarte prin ataxie, fără simptome de xeroftalmie. *b.* — la păsările mature se constată și modificări caracteristice la nivelul tubului digestiv (fotografiile *a* și *b* sînt reproduse după Trufanov, 1959). *c.* — avitaminoza *A* la om se manifestă prin keratomalacie, înmuierea și necroza corneii (după Bloch).

conjunctiva capătă un aspect uscat-grăsos, mai accentuat la unghiurile ochiului, albul ochiului capătă un aspect tulbure, corneea devine rugoasă, insensibilă la atingere. Această stare, cunoscută sub denumirea de *xeroftalmie* (*xeros* = uscat ; *ophtalmus* = ochi), poate progresa rapid și uneori orbirea survine în decurs de cîteva ore.

Keratomalacia (*keratos* = corn, *malacie* = înmuiere, tumefiere) este determinată de o avitaminoză *A* avansată și se manifestă prin înmuierea corneei concomitent cu atrofie, o regresiune a globului ocular. Keratomalacia este o afecțiune acută, care progresează rapid și, de obicei, afectează ambii ochi. Dezintegrarea necrotică și sclerozarea corneei, principalele semne clinice specifice keratomalaciei, sînt catastrofale, dacă tratamentul nu este instituit la momentul oportun.

Xeroftalmia și keratomalacia sînt *simptome specifice* pentru avitaminoza *A*, în timp ce alte manifestări clinice ale carenței de vitamină *A*, ca de exemplu, *xerodermia*, *leziunile cutanate*, *hiperkeratoza foliculară*, *afecți-*

uni ale aparatului respirator, nu se datoresc întotdeauna carenței de vitamină *A*; se poate constata și *keratinizarea și descompunerea epiteliilor uretro-vezicale și ureterale, formarea de calculi renali*, o *colpokeratoză* însoțită uneori de un *oestru prelungit* și altele. Toate aceste anomalii ale epiteliilor pot avea o etiologie variabilă, unele datorîndu-se carenței de vitamină *A*, altele lipsei de vitamină *C*, lipsei unei componente din complexul vitaminelor *B* etc.

În cazul de *hipovitaminoză A* se constată apariția unor infecții gingivale (parodontoza), scăderea secreției glandelor lacrimale și sebacee (uscarea pielii), glandelor sudoripare, glandelor stomacale etc.

Stările de *hipervitaminoză A* sînt însoțite de cașecsii, infecții ale globului ocular, depilări și alte simptome patologice.

Necesitățile zilnice de vitamină A *în cazul organismului uman sînt în funcție de diferiți parametri: greutatea corporală, vîrsta pacienților, natura climatului, prezența unor alte substanțe în alimentație* etc. În general, este admis că doza zilnică de vitamină *A* pentru un organism adult este de 2 000 UI (unități internaționale — o unitate internațională de vitamină *A* este echivalentă cu 0,344 μg acetat de vitamină *A* sau cu 0,30 μg de vitamină *A* (retinol), 0,60 μg de β-caroten. Pentru un om, în greutate de 70 kg, doza zilnică de vitamină *A* se recomandă să fie de 1 500 UI și chiar să depășească această cifră pentru a crea posibilitatea unei depuneri a vitaminei *A* în ficat în vederea asigurării unui factor de securitate a organismului. Cantitatea de β-caroten în alimentație trebuie să fie de două ori mai mare decît necesitatea organismului în vitamină *A*, adică de aproximativ 3 000 UI.

18.12 BIOSINTEZA LIPIDELOR COMPLEXE

Biosinteza *acizilor fosfatidici, fosfatidi colinei, fosfatidiletanolaminei, fosfatidilserinei*, a *inozitolfosfatidelor* și a *plasmalogenelor* au unele trăsături comune. Sinteza α, β-diacilglicerolilor și a *acidului fosfatidic* au fost descrise mai sus și ambele constituie etape premergătoare în biosinteza fosfolipidelor enumerate.

18.12.1 Sinteza fosfatidilcolinei și fosfatidiletanolaminei

Sinteza fosfatidilcolinei și fosfatidiletanolaminei necesită înainte de toate o activare a colinei și etanolaminei cu formare de derivați fosforilați care ulterior pot reacționa cu acidul citidintrifosforic (CTP) cu formare de *citidindifosfat colină* sau *citidindifosfat etanolamină*. K e n n e d y și a l ț i i au adus contribuții însemnate la studiul sintezei fosfatidelor arătînd că în ficat concentrația CDP-colinei este deosebit de mare. Mecanismul reacțiilor este redat în figura 18.16. Dacă reacția este catalizată de *fosforilcolină glicerol transferază* sau de *fosforilaminoetanol glicerol transferaza*

legătura difosforică este scindată și rezultă o bază azotată fosforilată (Colină-Ⓟ sau Etanolamină-Ⓟ) care este transferată pe un α, β-diglicerol cu formare de fosfatidilcolină sau fosfatidiletanolamină.

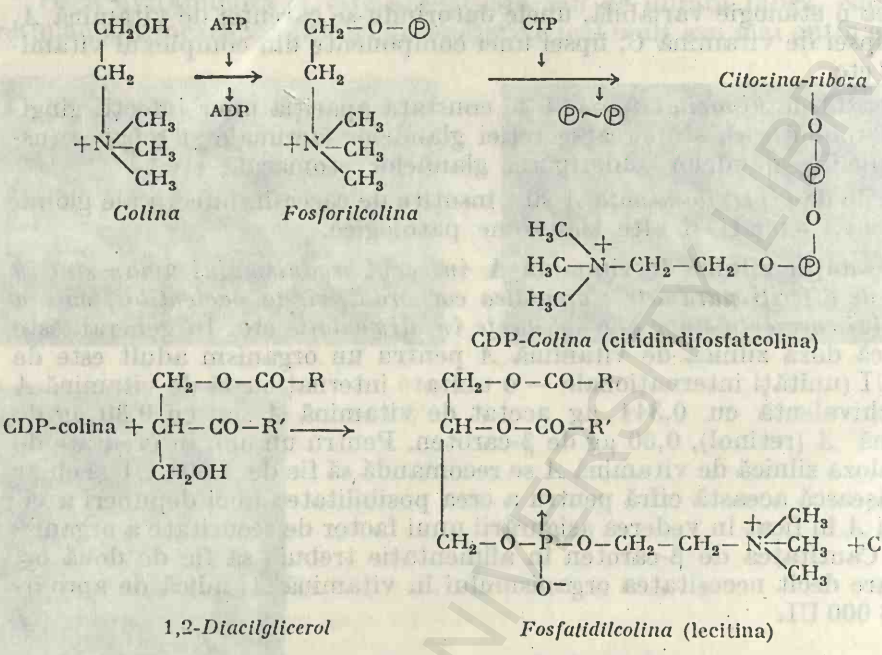


Fig. 18.16. — Biosinteza citidindifosfat colinei.

Această modalitate de sinteză presupune utilizarea colinei alimentare, deci de origină exogenă și constituie mai degrabă o cale de excepție.

1,2-Diacilglicerolii pot proveni fie dintr-un triacilglicerol fie dintr-un acid fosfatidic hidrolizat enzimatic de o fosfatază. Fosforilcolina poate să rezulte, de asemenea, și din fosfatidiletanolamină care în prezența S-adenozilmetioninei este metilată succesiv, la nivelul microzomilor ficatului, după următoarea reacție globală:

Fosfatidiletanolamină + S-Adenozilmetionină →

Fosfatidilcolină + S-Adenozilhomocisteină*.

Fosfatidiletanolamina care este utilizată în această reacție poate proveni și din decarboxilarea de către *fosfatidilserin decarboxilază* a fosfatidilserinei.

Microorganismul *Neurospora* posedă două tipuri de enzime de metilare a fosfatidiletanolaminei: într-o primă etapă o enzimă metilează acest compus cu formare de *fosfatidilmonometildietanolamină*, iar în următoarea etapă, o altă enzimă metilează acest compus de două ori succesiv cu formare de fosfatidilcolină.

* Formulele structurale ale compușilor sînt scrise desfășurat în capitolele 11 și 19.

Biosinteza fosfatidilcolinei prin mecanismul metilării treptate a fosfatidiletanolaminei a fost confirmată prin identificare în țesuturi a derivaților N-monometilați și N, N-dimetilați ai fosfatidiletanolaminei.

18.12.2 Biosinteza fosfatidilserinei

Se realizează la mamifere în cursul unor reacții de schimb în care fosfatidiletanolamina servește drept substrat.

$$\text{Fosfatidiletanolamină} + \text{Serina} \xrightarrow{Ca^{2+}} \text{Fosfatidilserină} + \text{Etanolamină}$$

La microorganisme biosinteza fosfatidilserinei are loc după reacțiile:

$$\text{Acid L-}\alpha\text{-fosfatidic} + \text{CTP} \underset{}{\overset{Mg^{2+}}{\rightleftharpoons}} \text{Citidindifosfodiacilglicerol}$$

$$\text{CDP-Diacilglicerol} + \text{Serină} \longrightarrow \text{Fosfatidilserina} + \text{CMP}$$

18.12.3 Sinteza inozitolfosfolipidelor

A fost studiată de K e n n e d y și H o k i n care au demonstrat că etapele inițiale constau, de asemenea, în sinteza acizilor glicerolfosfatidici care ulterior reacționează cu CTP cu formare de *citidinfosfatdiglicerol* (v. fig. 18.17). Această substanță este scindată și acidul fosfatidic rezultat este transferat, de către enzima *acid fosfatidic inozitoltransferaza*, la inozitol, rezultînd un inozitolfosfatid și CMP.

Di- și tri-fosfoinozitidele sînt sintetizate, de exemplu, în sistemul nervos central unde este prezentă enzima *fosfatidilinozitol kinaza* prin

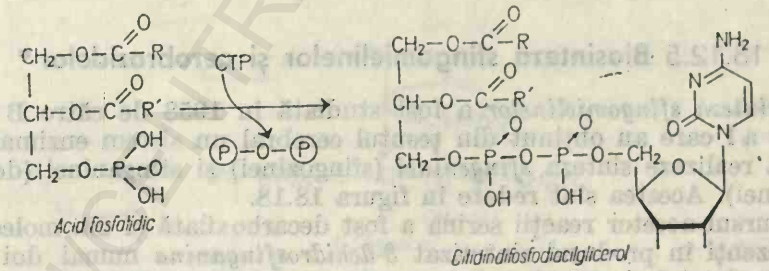
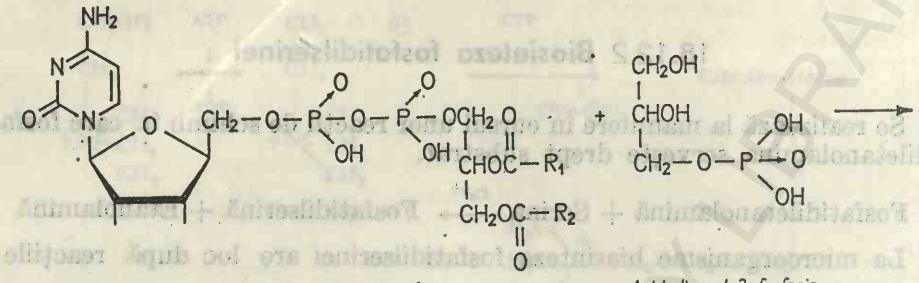


Fig. 18.17. — Biosinteza citidindifosfodiacilglicerolului, intermediar în biosinteza inozitolfosfolipidelor.

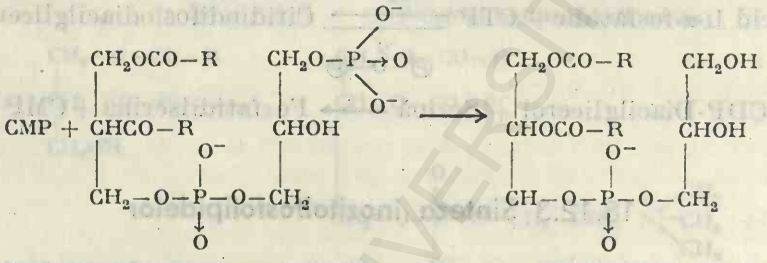
fosforilări succesive. În acest caz sursa grupărilor fosforice o constituie ATP și reacția are nevoie de prezența în mediu a ionilor bivalenți de Mg^{2+} și Mn^{2+}.

18.12.4 Sinteza fosfatidilglicerolilor

Acidul citidintrifosforic este utilizat și în procesele de biosinteză a fosfatidilglicerolilor care decurg după următoarea schemă :



Citidindifosfat diacilglicerol *Acid glicerol-3-fosforic*



Acid 3-fosfatidil-1'-glicero fosforic *3-Fosfatidil-1'-glicerol*

Plasmalogenele sînt după opinia lui K e n n e d y, sintetizate pe o cale asemănătoare cu cea a fosfatidilcolinei și fosfatidiletanolaminei însă pe baza unui diglicerol care posedă o grupare aldehidogenă la carbonul din poziția α (sau β) (CH_2—O—CH=CH—R). Această ipoteză se bazează pe observația că din ficat și din alte țesuturi au fost izolate sisteme enzimatice capabile să realizeze o reacție a „diglicerolilor plasmalogenici" cu derivații CDP-colinei și CDP-etanolaminei.

18.12.5 Biosinteza sfingomielinelor și cerobrozidelor *

Biosinteza sfingomielinelor a fost studiată în 1958 de către B r a d y și K o v a l care au obținut din țesutul cerebral un sistem enzimatic capabil să realizeze sinteza *sfingeninei* (sfingozinei) și sfinganinei (dehidrosfingozinei). Acestea sînt redate în figura 18.18.

În cursul acestor reacții serina a fost decarboxilată și din molecula ei sînt prezenți în produsul sintetizat *3-dehidrosfinganina* numai doi atomi de carbon (α și β ai serinei) la care se găsesc grefate grupările alcool primar și amină. În această reacție de condensare sînt utilizați acil ~ SCoA care au 14C și 18C, iar în reacția de reducere, care îi urmează, sînt folosite 3-dehidrosfinganinele care au între C_{14} și C_{18}.

* Termenii din acest subcapitol scriși în paranteze nu mai sînt recomandați de IUB și IUPAC, dar sînt utilizați pentru a înlesni lectura cititorului neavizat de modificarea lor.

D-Sfinganina rezultată în cursul biosintezei poate fi utilizată în continuare pentru biosinteza sfingeninei în cadrul unui proces de dehidrogenare în care acceptorul de hidrogen este FAD. Ulterior sfingenina reac-

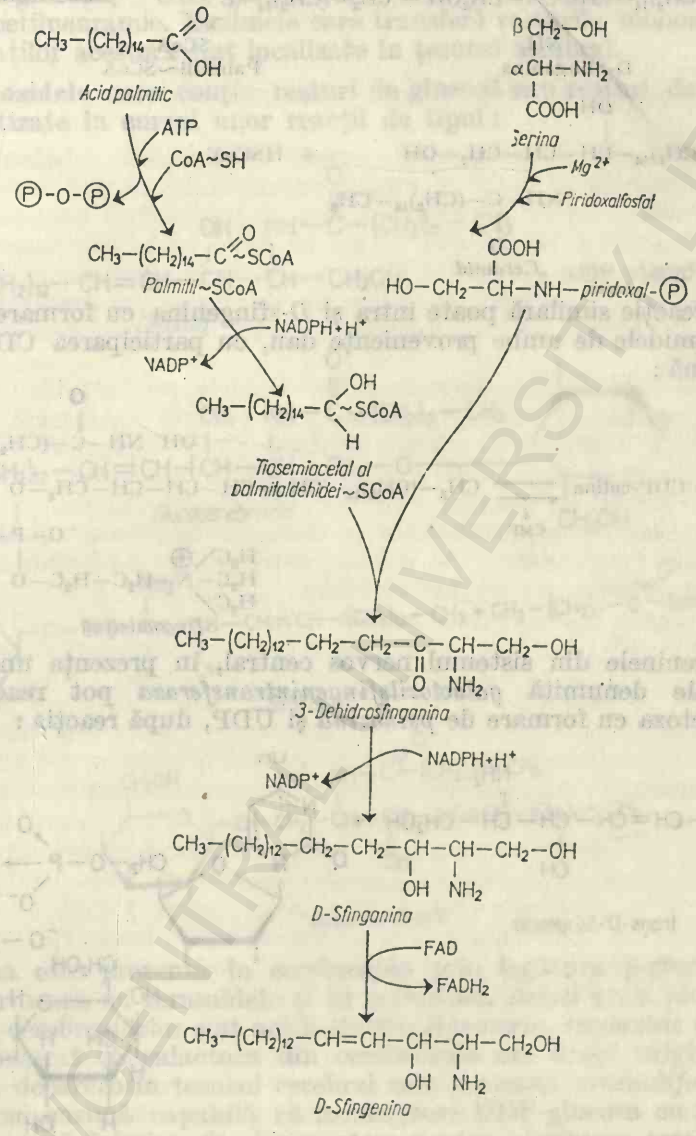
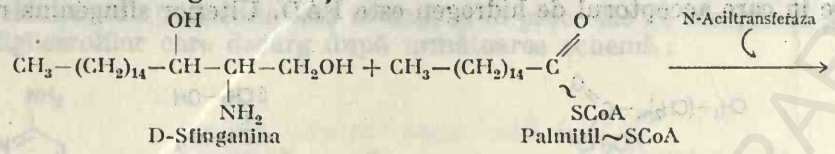


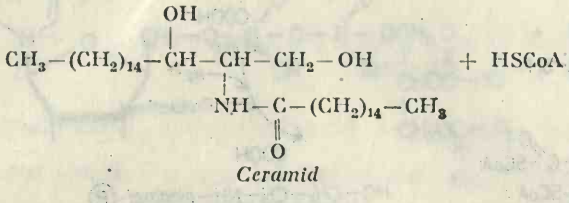
Fig. 18.18. — Sinteza sfingeninei și sfinganinei.

ționează cu un acil-CoA, provenit de la un acid gras cu catenă lungă, la nivelul grupării amino rezultînd *N-acilsfingenină* sau *ceramidă*. O enzimă specifică, *fosforilcolinceramidtransferaza*, catalizează reacția dintre CDP-

48 — c. 636 40

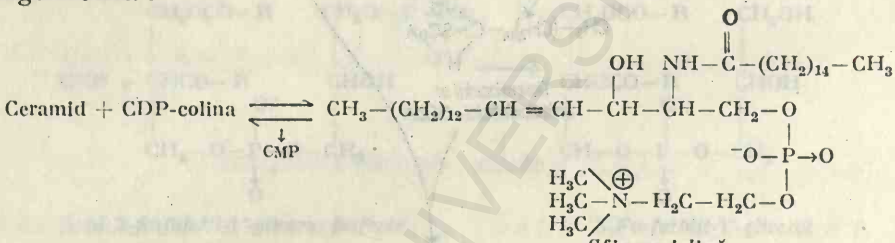
-colină și ceramidă în cursul căreia fosforilcolina este transferată ceramidei cu formare de sfingomielină și CMP.





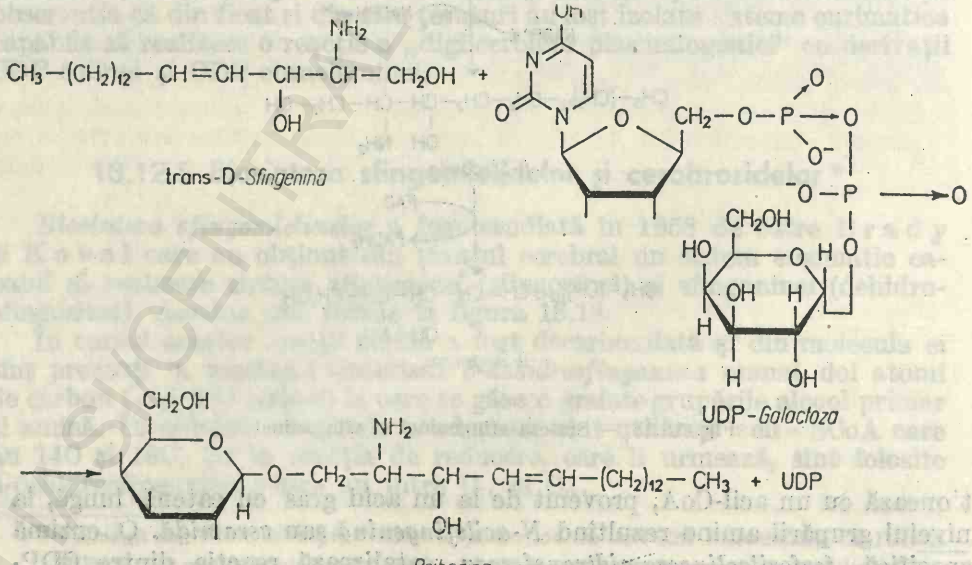
Ceramid

Într-o reacție similară poate intra și *D*-sfingenina cu formare de ceramide. Ceramidele de ambe proveniențe dau, cu participarea CDP-colinei, sfingomielină :



Sfingomielină

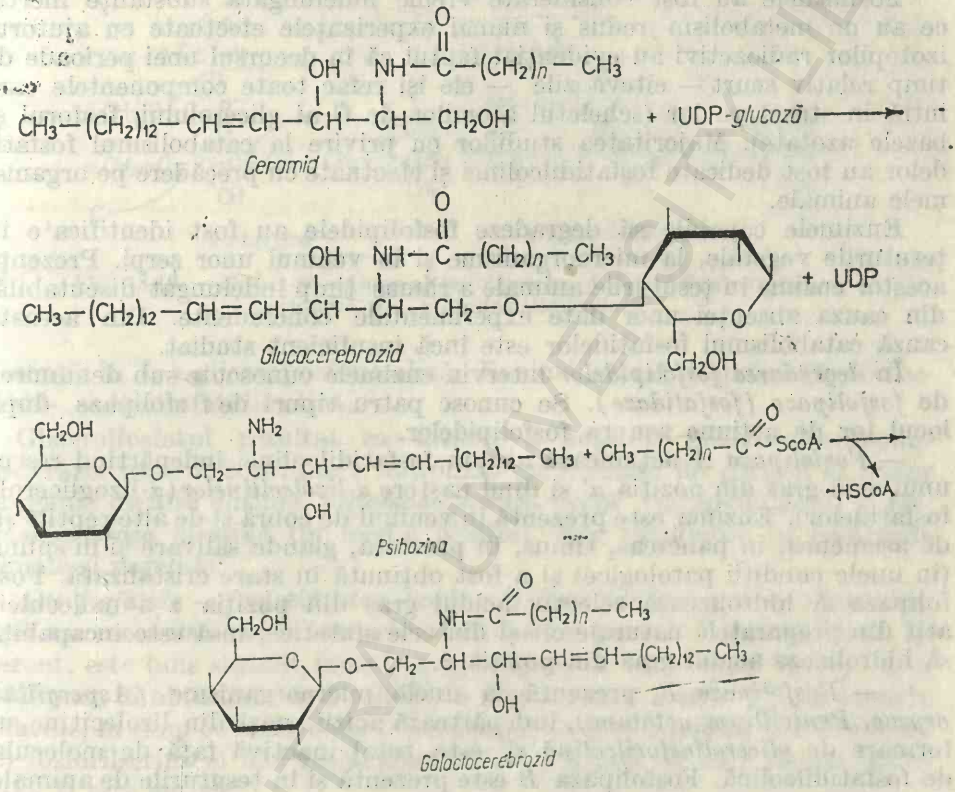
Sfingeninele din sistemul nervos central, în prezența unei enzime microzomale denumită *galactozilsfingenintransferaza* pot reacționa cu UDP-galactoza cu formare de *psihozină* și UDP, după reacția :



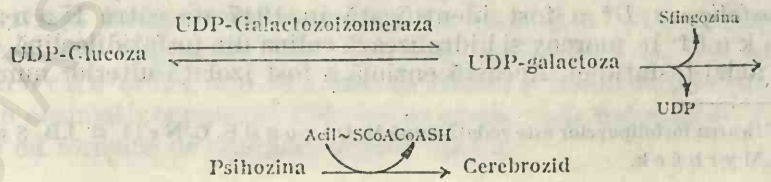
Psihozina

Biosinteza glicolipidelor. *Glicolipidele* sînt derivaţi ai ceramidelor care conţin în molecula lor un rest al unui monozaharid care este transferat pe cale enzimatică dintr-un compus nucleotidic al acestuia, de exemplu, din UDP-glucoză, UDP-galactoză, UDP-N-acetilgalatozamină, acid CMP-N-acetilneuramic. Enzimele care transferă resturile monozaharidelor sau derivaţilor acestora sînt localizate în ţesutul cerebral.

Cerebrozidele care conţin resturi de glucoză sau resturi de galactoză sînt sintetizate în cursul unor reacţii de tipul:



Hexoza este prezentă în cerebrozide prin legătura β-glucozidică pe care o formează cu ceramidele şi cu psihozina. Acizii graşi identificaţi în structura cerebrozidelor sînt acizii *stearic*, *lignoceric*, *cerebronic* şi *nervonic*. S-a demonstrat că galactoza din cerebrozide are drept origină glucoza cerebrală, deoarece în ţesutul cerebral este prezentă *uridindifosfatgalactozoizomeraza*, enzimă capabilă să izomerizeze UDP-glucoza cu formare de UDP-galactoză, folosită ulterior ca atare pentru biosinteza cerebrozidelor:



În fracţia microzomală a ţesutului cerebral enzima *galactocerebrozid sulfokinaza* catalizează reacţia de formare a esterilor sulfurici ai cerebrozidelor în care *acidul 3'-fosfoadenozin-5'-fosfosulfuric* joacă rolul de donor de grupări sulfurice.

18.12.6 Degradarea fosfolipidelor, sfingolipidelor şi cerebrozidelor

Fosfatidele au fost considerate vreme îndelungată substanţe inerte, ce au un metabolism redus şi numai experienţele efectuate cu ajutorul izotopilor radioactivi au evidenţiat faptul că în decursul unei perioade de timp relativ scurt — cîteva zile — ele îşi refac toate componentele care intră în structura lor (scheletul atomilor de C ai glicerolului, fosforul şi bazele azotate). Majoritatea studiilor cu privire la catabolismul fosfatidelor au fost dedicate fosfatidilcolinei şi efectuate cu precădere pe organismele animale.

Enzimele capabile să degradeze fosfolipidele au fost identificate în ţesuturile vegetale, la microorganisme şi în veninul unor şerpi. Prezenţa acestor enzime în ţesuturile animale a rămas timp îndelungat discutabilă, din cauza absenţei unor date experimentale concludente. Din această cauză catabolismul fosfatidelor este încă insuficient studiat.

În *degradarea fosfolipidelor* intervin enzimele cunoscute sub denumirea de *fosfolipaze (fosfatidaze)*. Se cunosc patru tipuri de fosfolipaze, după locul lor de acţiune asupra fosfolipidelor.

— *Fosfolipaza A* acţionează asupra fosfatidilcolinei îndepărtînd restul unui acid gras din poziţia α' şi dînd naştere *α-lizolecitinelor* (α-lizoglicerolfosfatidelor). Enzima este prezentă în veninul de cobra şi de alte reptile şi, de asemenea, în pancreas, timus, în prostată, glande salivare şi în splină (în unele condiţii patologice) şi a fost obţinută în stare cristalizată. Fosfolipaza A hidrolizează selectiv acidul gras din poziţia α a moleculei, atît din preparatele naturale cît şi din cele sintetice, însă este incapabilă să hidrolizeze acidul gras din poziţia β.

— *Fosfolipaza B*, prezentă la unele microorganisme *(Aspergillus oryzae, Penicillium notatum)*, îndepărtează acizii graşi din lizolecitine cu formare de *glicerolfosforilcolină* şi este total inactivă faţă de molecula de fosfatidilcolină. Fosfolipaza *B* este prezentă şi în ţesuturile de animale (ficatul de şobolan şi de capră, pancreas) şi a fost cristalizată.

— *Fosfolipaza C* a fost obţinută în 1941 din toxina de *Clostridium welchii* şi hidrolizează fosfatidilcolina cu formare de α(α')-diacilglicerol şi fosforicolină şi este inactivă faţă de alte glicerolfosfatide (fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina), precum şi faţă de lizofosfatidilcolină şi glicerol fosforilcolină; în ţesuturile animale a fost semnalată numai în creier şi rinichi.

— *Fosfolipaza D** a fost identificată în 1947 de către Hanahan şi Chaikoff în morcov şi hidrolizează colina din fosfatidilcolină cu formare de acizi fosfatidici. Această enzimă a fost izolată ulterior numai din

* Clasificarea fosfolipazelor este redată după M. Dixon şi E. C. Nell şi J.B. Sumner şi R. Myrbäck.

vegetale (varză, sfeclă de zahăr, spanac, seminţe de bumbac etc.) şi este absentă în ţesuturile animale. Este capabilă să hidrolizeze şi colina prezentă în lizofosfatidilcolină.

Modul de acţiune al diferitelor fosfolipaze este redat schematic în figura 18.19.

O altă enzimă, *glicerolfosforilcolindiesteraza*, identificată la *Serratia plymuticha*, în ficat, în creier şi în alte ţesuturi animale hidrolizează colina

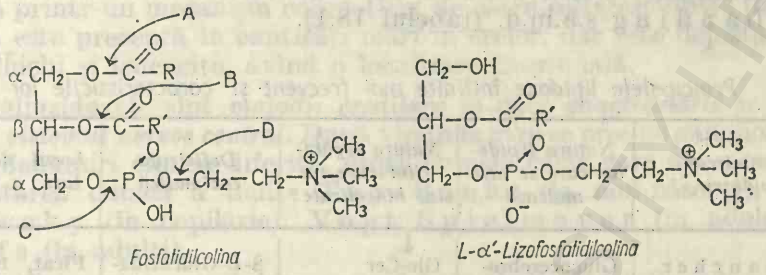


Fig. 18.19. — Modul de acţiune al fosfolipazelor *A*,*B*,*C* şi *D* şi structura chimică a L-α'-lizofosfatidilcolinei.

prezentă în L-α-glicerolfosforilcolină. Enzima este inactivă faţă de fosfatidil- şi lizofosfatidilcolină.

Glicerolfosfatul rezultat ca urmare a acţiunii glicerilfosforilcolindiesterazei este în continuare hidrolizat cu formare de glicerol şi fosfor anorganic de alte enzime, *fosfomonoesteraza acidă* (în mediu acid) şi *fosfomonoesteraza alcalină* (în mediu alcalin), larg răspîndite în ţesuturile animale şi vegetale.

Alte fosfatide — fosfatidiletanolamina şi *fosfatidilserina* sînt hidrolizate după un mecanism asemănător cu cel descris pentru fosfatidilcolină. În prezent, este bine stabilit faptul că fosfolipaza *A* din veninul de reptile şi fosfolipaza *B* obţinută din *Penicillium notatum* sînt active faţă de ambele fosfatide, în timp ce fosforilaza *C* bacteriană nu este capabilă să hidrolizeze nici fosforilserina şi nici fosfatidiletanolamina, faţă de care numai fosforilaza *D* este activă.

Fosforilaza *A* poate, de asemenea, hidroliza cu o viteză mult mai mică o moleculă de acid gras prezentă în *plasmalogen*, iar fosfolipaza *C* este capabilă să hidrolizeze fosforilcolina prezentă în plasmalogenii colinici.

Sfingomielinele sînt degradate de o enzimă, insuficient caracterizată din punct de vedere biochimic „sfingomielinaza", care hidrolizează sfingozilfosforilcolina, cu formare de acid gras, sfingozină şi fosforilcolină.

În privinţa inozitolfosfatidelor H a n a h a n şi a l ţ i i au arătat că acestea nu sînt degradate sub influenţa fosfolipazei *A*, în timp ce H a w t h o r n e şi K e m p au arătat că ficatul şi inima de şobolan conţin un sistem enzimatic capabil să hidrolizeze preparatele naturale de inozitolfosfatide cu formare de compuşi organofosforici.

18.13 ERORI CONGENITALE ÎN METABOLISMUL LIPIDELOR

Acumularea lipidelor în mari cantităţi sub formă de depozite în anumite ţesuturi este genetic determinată şi cunoscută sub denumirea de *lipidoză*. După natura compusului lipidic care se acumulează în cantitatea cea mai mare şi adesea selectiv lipidozele poartă denumirea de *sfingolipidoze*, *sfingomielinoze*, *cerebrozidoze*, *sulfatidoze*, sau sînt desemnate după numele descoperitorilor — boala G a u c h e r, boala lui P f a u n d l e r-H u r l e r, boala L a n d i n g ş.a.m.d. (tabelul 18.1).

TABELUL 18.1

Principalele lipidoze întîlnite mai frecvent şi caracteristicile lor

Denumirea lipidozei	*Natura lipidelor care se acumulează*	*Natura legăturilor care nu sînt hidrolizate* *	*Deficienţa enzimatică*	*Locul de acumulare a lipidelor*
Boala G a u c h e r sau cerebrozidoza	Glucocerebrozide	↓ Glc-Cer	β-*D*-Glucozidaza	Ficat, măduva osoasă, plămîni, leucocite, creier
Boala T a y-S a c h s sau gangliozidoza	Aminoglucolipide, gangliozide (GM_2)	↓ GalNAc-Gal- | -Glc-Cer NANA	β-*D*-hexozaminidaza *A*	Scoarţa cerebrală (substanţa albă şi substanţa cenuşie)
Boala N i e m a n n-P i c k sau sfingomielinoza	Sfingomieline	↓ Chln-P-Cer	Sfingomielinaza	Ficat, măduva osoasă, creier, retină
Boala F a b r y sau *angiokeratoma corporis diffusum*	Glucosfingolipide	↓ Gal-Gal- -Glc-Cer	α-*D*-galactozidaza	Vase sanguine, rinichi, sistem nervos, piele, inimă, reticul endotelial
Leucodistrofiile metacromatice sau sulfatidoza	Sulfatide	Gal-Cer |← OSO_3	Sulfatidaza	Creier, rinichi, vezică biliară, urină

* Prescurtările folosite pentru a indica natura lipidelor care se acumulează şi a legăturilor care nu mai sînt scindate sînt următoarele: Glc — glucoză; Gal — galactoză; Cer — ceramid; GalNAc — N-acetil-galactozamină; NANA — acid N-acetilneuraminic; Chln — colină, iar săgeţile arată legătura covalentă dintre componentele lipidului care trebuie ruptă în condiţii normale.

Sfingolipidoze. Acumularea lipidelor care conţin sfingozină în molecula lor în sistemul nervos central, în sistemul reticulo-endotelial sau în rinichi este cunoscută sub denumirea generică de *sfingolipidoze*. În funcţie de natura lipidului acumulat se deosebesc diferite boli, fiecare caracterizată prin dereglări metabolice specifice (Z o l l n e r şi W o l f r a m, 1970).

Sfingomielinoza sau boala Niemann-Pick se caracterizează prin *acumularea sfinogomielinei în splină, ficat şi creier*, asociată uneori cu un

nivel mai mare de colesterol și de gangliozide. S-a semnalat de asemenea, că natura acidului gras din sfingomielinele individului normal și bolnav este diferită. Copiii bolnavi se nasc cu o greutate normală, se dezvoltă bine în prima săptămînă după care survin modificări: încetează treptat să mănînce, distensie abdominală, hepatosplenomegalie, umflarea ganglionilor limfatici, modificări la nivelul globului ocular, lipsa de reacție la voce și la sunete, pierderea funcțiilor motorie și psihică, debilitate completă și moartea prin caşecsie la vîrsta de 20—25 luni. Maladia are o incidență de 1/100 000 și este cauzată de absența unei enzime — *sfingomielinaza* — sau inhibiția acesteia printr-un mecanism competitiv de către *colinfosfolipide* (lecitine). Enzima este prezentă în cantități mari în creier, dar este depistată și în ficat, rinichi și leucocite, avînd o localizare lizozomală.

Gangliozidozele sînt *maladii ereditare* în care *gangliozidele se acumulează în sistemul nervos central.* După vîrsta la care se produc gangliozidozele poartă denumiri clinice diferite, după numele celor care au caracterizat manifestarea clinică a bolii: T a y - S a c h s (la noii-născuți), B i e l s c h o w s k y (în copilărie), V o g t - S p i e l m e y e r (în adolescență) și K u f s (la adulți).

Cercetări recente au demonstrat că în maladia T a y-S a c h s în serul bolnavilor este deficientă sau total absentă *fructoza-1-fosfataldolaza*; această enzimă este absentă și în serul sanguin al părinților și în 50 % din cazuri a fost absentă și la bunicii bolnavilor. S a n d h k o f f, O k a d a și O' B r i e n au arătat că gangliozidul *ceramid-glucoză-galactoză (NANA)-N-acetilgalactozamină* este hidrolizat de hexaminidază și că în țesutul normal se întîlnesc două hexozaminidaze: *A*-termolabilă și care în electroforeză migrează spre anod și *B* — termostabilă, iar în electroforeză migrează extrem de lent spre catod. În funcție de absența hexozaminidazelor *A* și *B* care pot fi concomitentă sau parțială se întîlnesc diferite tipuri biochimice de gangliozidoze.

Boala L a n d i n g *concretizată prin întîrzierea dezvoltării psiho-motorii, tulburării de vedere, evoluție rapidă și fatală se datorește acumulării în ficat și în creier a ceramid-fucozogalactozo(NANA)-N-acetilgalactozoaminogalactozei* și a mucopolizaharidelor care conțin acid sialic. Cauza acestei maladii constă într-o activitate nulă sau extrem de redusă a *β-galactozidazelor.*

Cerebrozidoza sau boala G a u c h e r sau glucocerebrozidoză. Celulele G a u c h e r se formează din reticulul celulelor arteriolelor mici, sînt ovale sau poligonale și conțin uneori 10—12 nuclei, un complex *cerebrozido-proteic* și fosfatază acidă extrem de activă. În aceste celule mari derivate din reticulul endotelial se acumulează un cerebrozid, *cherazina*, glucocerebrozide, gangliozide și cerebrozide datorită, probabil, absenței unei enzime β-glucozidaza — care hidrolizează glucocerebrozidele. Boala G a u c h e r este considerată o *boală ereditară.* Formele infantile sînt însoțite de *tulburări neurologice grave și de splenomegalie* și sînt uneori fatale; formele tardive survenite în timpul adolescenței sau instalate la adulți sînt ușoare și deficitul enzimatic este parțial.

Boala P f a u n d l e r-H u r l e r constă în *piticism, deformări osoase, hepatosplenomegalie, înapoiere mintală și este o boală ereditară.* Din punct

de vedere biochimic s-a constatat *o creştere considerabilă a gangliozidelor în creier, ficat şi splină*; alţi autori au semnalat acumularea mucopolizaharidelor în ficat şi au considerat maladia ereditară drept o mucopolizaharidoză. În sprijinul acestei opinii vin şi datele lui Dorfman şi Lorincz (1957) care au izolat din urina bolnavilor *condroitin sulfatul* şi *heparin sulfatul*, iar Austin şi alţii (1964) semnalează o creştere importantă a *arilsulfatazei B* în urina bolnavilor. Relaţia dintre gangliozide şi mucopolizaharide în boala Pfaundler-Hurler rămîne neclarificată.

Angiokeratoma corporis diffusum sau boala Fabry este, de asemenea, *o boală ereditară* şi constă în *acumularea în pereţii vaselor sanguine din piele şi din organe de ceramid-dihexozide* şi *ceramid-trihexozide* (Sweeley şi Klionsky, 1963, 1964). Boala se întîlneşte la bărbaţi şi se manifestă prin *leziuni multiple ale dermei, sub formă de pete distribuite în regiunile lombosacrală, ombilicală şi genitală;* simptomatologia constă în *sistarea secreţiei de sudoare, febră, anemie, dereglări vaso-motorii, gastrointestinale, cerebro-vasculare, dureri de cap, hemipareză, hemiplegii, scăderea acuităţii vizuale.* Cauzele şi tratamentul specific al bolii rămîn necunoscute. Leziunea biochimică constă în acumularea unui *ceramid-trihexozid — galactozil-galactozil-glucozil-ceramid*, un sfingolipid deosebit — în plasma sanguină, în rinichi, creier şi miocard; acest trihexozid-ceramid este eliminat şi în urină. Brady şi colab. au arătat că în toate ţesuturile există o enzimă *trihexozil ceramid hidrolaza* care posedă o înaltă specificitate şi este o α-galactozidază în absenţa căreia se dezvoltă această maladie.

Sulfatidozele sau leucodistrofiile metacromatice *sînt boli ereditare degenerative difuze, însoţite de demielinizări difuze ale sistemului nervos şi de acumularea sulfatidelor.* Însoţită de deteriorarea funcţiei motoare, dificultăţi de vorbire, încetinirea dezvoltării psihice, ataxie, paralizia muşchilor globului ocular. nistagmus, atrofia ochiului şi pierderea vederii, rigiditate şi spasme, sulfatidozele se caracterizează prin eliminarea în urină a *N-acilsfingozin-glucoză-galactoză-sulfat* (Svennerholm şi Svennerholm, 1963) şi de o diminuare a activităţii *aril sulfatazei A* care reprezintă numai 2 % din activitatea ei normală (Austin şi alţii, 1964) şi prin micşorarea raportului cerebrozide-sulfatide, care scade în sistemul nervos de la 4 la 0,25. Ţesuturile animale conţin două fracţii principale de arilsulfatază localizate în lizozomi — arilsulfataza *A* (*p*H optim 5) şi arilsulfataza *B* (*p*H optim 6) şi o a treia fracţie localizată în microzomi şi dotată cu o specificitate de acţiune diferită. Numai arilsulfataza *A* poate hidroliza ceramid-galactozil-sulfatul şi lipsa ei determină dezvoltarea eucodistrofiei metacromatice.

18.14 FACTORI CARE INFLUENŢEAZĂ METABOLISMUL LIPIDELOR

Metabolismul lipidelor este puternic influenţat de starea funcţională a glandei tiroide. Hipertiroidismul determină un consum rapid al lipidelor în timp ce hipotiroidismul favorizează depozitarea lor. În cazul hipertiroidismu-

lui concentrația colesterolului și a lipidelor sanguine scad sensibil. De asemenea, s-a observat că injectarea de hormon somatotrop animalelor hipofizectomizate sau animalelor tinere determină acumularea de acizi grași neesterificați în plasmă, probabil ca urmare a unui proces de lipoliză la nivelul țesutului adipos. Administrarea îndelungată de hormon de creștere poate duce la apariția stărilor de *cetonemie* și *cetonurie*, rezultate în urma degradării acizilor grași mobilizați din rezervele de lipide. S-a emis ipoteza că acumularea acizilor grași neesterificați în plasmă constituie sursa care furnizează energia necesară proceselor de biosinteză a proteinelor.

K e d a și a l ț i i (1968) presupun că mobilizarea acizilor grași și creșterea concentrației lor în plasmă sînt rezultatul acțiunii unui factor lipomobilizant, reprezentînd o stare agregată a STH. Substanțele cetonice *(acetona, acidul acetoacetic, acidul β-hidroxibutiric)* care apar în sînge sînt excretate pe cale urinară. Acești compuși cetonici se formează și în mod normal prin oxidarea acizilor grași, însă în acest caz concentrația lor este mică 1,5—2 mg%. Corpii cetonici se acumulează în sînge și în *diabetul zaharat decompensat* cînd cantitatea lor depășește posibilitățile normale de utilizare în celulă, creînd starea de *cetonurie* și de *acidoză* (diminuarea *p*H umoral prin scăderea rezervei alcaline a sîngelui).

Metabolismul lipidelor depozitate în țesutul adipos este influențat de hormonul lipolitic. Preparatele de β-LPH, izolate din hipofiza de oaie au o mare activitate lipolitică în primele 40—80 minute. Dacă sînt injectate iepurilor, după 120—180 minute se constată o scădere accentuată a calciului. C h r e t i e n și a l ț i i (1973) remarcă că la animalele tiroidectomizate *hipocalcemia* sub influența β-LPH nu se mai declanșează. Această situație ar fi explicabilă, după părerea autorilor, printr-o captare a calciului de către celulele adipoase în timpul lipolizei, cînd concentrația *acizilor grași liberi* intracelulari crește foarte mult. În absența calciului din mediu efectul lipolitic al β-LPH este inhibat, ceea ce reamintește de necesitatea acelorași ioni pentru activitatea lipolitică a ACTH, care acționează la rîndul său asupra celulei lipolitice, determinînd o creștere a pătrunderii calciului în celulă și acumularea lui intracelulară (Y a n a g i și a l ț i i, 1967, 1969; L o p e z, W h i t e și E n g e l, 1959).

In vivo β-LPH administrat iepurilor induce o coagulare mai rapidă mai ales cînd procesul de lipoliză este maxim, hipocalcemia este mare, iar adezivitatea plachetară este crescută. β-LPH activează și adenilat ciclaza, dar și acest proces este dependent de calcemie.

În prezent se cunosc numeroase substanțe cu acțiune lipolitică. Din hipofiza diferitelor animale au fost obținute fracții care au o acțiune lipolitică manifestă în experiențele efectuate cu țesuturi adipoase de diferite proveniențe. Astfel, L e i t e s și D a r t y a n (1965) au izolat fracții cu acțiune lipolitică din hipofiza de porc, cal și de om, după cum L a n d o l t și A s t w o o d (1961) obțin extracte lipolitice din hipofiza anterioară de porc pe care ulterior A s t w o o d și a l ț i i (1961) și B a r r e t t și a l ț i i (1962) le caracterizează ca fiind două peptide: *Peptida I* și *peptida II*. Alți autori au izolat din extractele acetonice hipofizare de porc două peptide cu acțiune lipolitică pe care le-au denumit *peptidele 706 și 707* (R u d m a n, D e l R i o, G a r c i a, B a r n e t, și a l ț i i, 1970).

Substanțe cu acțiune lipolitică au fost identificate și în urina de om, cîine, cal, capră și oaie „a jèun". C h a l m e r s, P a v a n, R e k w i c k

(1960) extrag o substanţă care mobilizează lipidele, denumită de ei FMS — substanţa care mobilizează grăsimile (*„fat mobilizing substance"*). Spre deosebire de ceilalţi factori sau fracţii lipolitice ale hipofizei, acest FSM acţionează diferenţiat asupra ţesuturilor adipoase de şobolan şi de şoarece şi este inactiv în cazul ţesutului adipos de iepure.

Din urina de iepure, Weil şi Stetten (1947) au izolat o substanţă, necaracterizată chimic, care injectată şoarecilor determină o acumulare de grăsimi neutre în ficat.

Mai mulţi hormoni hipofizari au acţiune lipolitică directă determinînd modificări ale metabolismului lipidic în ţesutul adipos de şobolan, şoarece şi de iepure. Printre aceşti hormoni se numără ACTH, MSH, TSH şi α-subunitatea LH şi după unii autori chiar arginin-vasopresina (Chretien, Lis, Bertagna, Cilardeau, 1973).

Hormonul lipotrop şi substanţele care posedă activităţi lipolitice par a avea în ţesutul adipos al epididimului de şobolan un corespondent de natură antagonistă, adică un *hormon antagonist*. Adipocitele de şobolan sub influenţa adrenalinei, ACTH şi a glucagonului secretă şi eliberează în mediu acest antagonist care inhibă capacitatea hormonului lipolitic de a determina sinteza sporită a acidului adenozin-3', 5'-monofosforic ciclic. Mai mult, o creştere a AMP-3', 5'-ciclic ca urmare a acţiunii hormonului lipolitic duce la formarea antagonistului hormonal care se acumulează în mediul de reacţie, în cursul perioadei necesare pentru ca AMP-ciclic să revină la concentraţia lui normală. Activitatea lipolitică hormonală este restabilită dacă adipocitele sînt spălate sau incubate în alt mediu de reacţie. După opiniile lui Ho şi Sutherland (1971) acest antagonist care poate participa la feed-back negativ, modulînd rolul hormonului şi reacţiile hormonale, nu este o prostaglandină *E*.

Procesele catabolice ale lipidelor tisulare şi serice (oxidarea acizilor graşi liberi, mobilizarea lipidelor din ţesutul adipos, degradarea colesterolului cu formare de acizi biliari etc.) sînt stimulate, de asemenea, de hormonii tiroidieni, excesul acestora avînd un efect stimulator.

În experienţele *in vivo* efectuate pe animale de laborator (ciine) perfuzia intraportală cu doze mici de *glucagon* provoacă o creştere accentuată a acizilor graşi liberi din plasma ţesuturilor periferice; dacă se injectează acizi graşi liberi sau concentraţia lor creşte sub influenţa altor factori se constată o scădere a *glucagonului imunoreactiv plasmatic*. Aceste date indică prezenţa unui mecanism *feed-back negativ* glucagon-acizi graşi liberi. Date similare au fost obţinute şi pe păsări ceea ce a determinat pe Mialhe Krug, Gross şi Desbals (1973) să considere că glucagonul este un hormon lipolitic, care îndeplineşte probabil un important rol fiziologic în lipoliza ţesutului adipos.

Cercetîndu-se influenţa unor doze relativ neînsemnate de glucagon (200 γ/zi) asupra animalelor de experienţă ţinute la o dietă standard fără colesterol s-a arătat că glucagonul are o *acţiune hipocolesterolemică*. Friedman şi alţii (1971) ajung pe baza acestor date experimentale la concluzia că glucagonul este un agent puternic reglator al concentraţiei colesterolului în sînge şi acţiunea hormonului somatotrop asupra nivelului colesterolemiei se realizează, probabil, prin intermediul unei hipersecreţii de glucagon.

Ciclul Randle. Numeroase observaţii clinice şi fapte experimentale privind mecanismele reglării procesului de lipoliză au condus pe R a n d l e şi colab. la elaborarea unei scheme integrate, cunoscută astăzi sub numele de ciclul lui R a n d l e.

In vitro, diafragma şi inima de şobolan, provenite de la animale cu *diabet aloxanic*, sau de la animale tratate cu STH şi cortizol, precum şi în cazul diafragmei izolate şi incubate în prezenţa STH şi adrenalinei, gliceridele sînt hidrolizate mai intens decît în mod normal. Hidroliza gliceridelor la animalele de laborator cu diabet aloxanic este diminuată numai după hipofizectomie. *In vitro*, insulina diminuează eliberarea glicerolului din adipocite, dar nu are acţiune asupra lipidelor diafragmei şi cordului. Pe de altă parte, s-a constatat că în diafragmă, concentraţia acizilor graşi este crescută cu 50 % în stările de inaniţie şi cu 100 % la animalele cu diabet aloxanic.

Creşterea concentraţiei acizilor graşi şi corpilor cetonici, atît în diabet cît şi în inaniţie, determină stocarea intracelulară a glucozei, ceea ce denotă că procesul fosforilării ei este lent. În experienţe *in vitro* s-a constatat că adăugarea în mediul de reacţie a corpilor cetonici are drept efect o creştere a glicogenului tisular chiar şi atunci cînd cantitatea de glucoză este limitată. În diabet şi în stările de inaniţie procesul de glicoliză poate fi încetinit prin administrarea de acizi graşi liberi şi de corpi cetonici. Acest efect este concomitent cu o acumulare în ţesut a glucozo-6-fosfatului. Obezitatea în cazurile de diabet este explicată de R a n d l e şi alţii (1963) prin faptul că insulina inhibă hidroliza gliceridelor în ţesutul adipos, dar n-are nici o influenţă asupra aceluiaşi proces la nivelul ţesutului muscular.

Pentru interpretarea acestor rezultate experimentale, R a n d l e propune ciclul glucozei şi acizilor graşi. Trăsăturile esenţiale ale acestui ciclu (fig. 18.20) constau în următoarele:

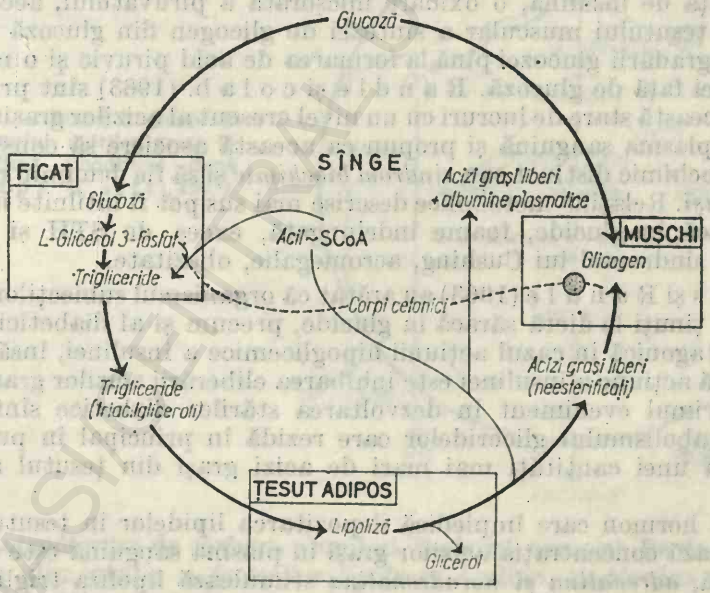


Fig. 18.20. — Ciclul lui R a n d l e sau ciclul glucozei-acizilor graşi liberi. Procesele de esterificare ale acizilor graşi au loc în ficat, iar procesele de lipoliză în ţesutul adipos.

— glucoza nu este utilizată normal de țesutul muscular datorită existenței în acesta a unei mari cantități de acizi grași proveniți atît din țesutul muscular cît și din țesutul adipos în urma procesului de lipoliză;

— acizii grași neesterificați trebuie să fie reîncorporați în gliceride, ei sînt esterificați cu CoASH cu formare de acil ~ SCoA care ulterior reacționează cu glicerofosfatul rezultat din glicoliză și dau trigliceride;

— acizii grași sînt parțial oxidați cu formare de corpi cetonici, atît în țesutul adipos cît și în țesutul muscular; oxidarea acizilor grași și a corpilor cetonici în țesutul muscular scade consumul tisular de glucoză;

— în timpul proceselor de lipoliză, glicerolul rezultat este eliminat în lichidul extracelular;

— declanșarea procesului de glicoliză în țesutul adipos inhibă transportul pe cale sangvină a acizilor grași; un efect similar a fost observat și în cazul corpilor cetonici din ficat.

Randle și alții interpretează acest ciclu ca un mecanism biochimic primitiv, independent de controlul hormonal, care tinde să mențină constantă glicemia la animalele care consumă hrana cu intermitență. Controlul proceselor metabolice prin intermediul ciclului lui Randle este modificat numai de insulină care poate determina creșterea consumului de glucoză de către țesuturile muscular și adipos, blocarea eliberării acizilor grași din țesutul adipos și creșterea vitezei de esterificare a lor atît în mușchi cît și în celulele adipoase. Alți hormoni, *STH* și *corticosteroizii*, adrenalina accelerează eliberarea acizilor grași din celulele adipoase și lipoliza gliceridelor din mușchi, dar inhibă consumul de glucoză de către mușchi prin instaurarea unei insensibilități induse față de insulină.

În numeroase boli nutriționale și endocrine s-au observat dereglări ample în metabolismul glucidelor care constau îndeosebi în pierderea sensibilității față de insulină, o oxidare micșorată a piruvatului, accentuarea la nivelul țesutului muscular a sintezei de glicogen din glucoză în detrimentul degradării glucozei pînă la formarea de acid piruvic și o micșorare a toleranței față de glucoză. Randle și colab. (1963) sînt primii care asociază această stare de lucruri cu un nivel crescut al acizilor grași neesterificați din plasma sanguină și propun ca această asociere să constituie un criteriu biochimic distinct sau *sindrom biochimic* și să fie denumit *sindromul acizilor grași*. Relațiile metabolice descrise mai sus pot fi întîlnite în diabet, dietă săracă în glucide, foame îndelungată, exces de STH și hormoni corticoizi, sindromul lui Cushing, acromegalie, obezitate.

Hales și Randle (1963) au arătat că organismul subiecților normali și al celor ținuți la dietă săracă în glucide, precum și al diabeticilor are o reacție antagonică în cazul acțiunii hipoglicemice a insulinei, însă cea mai importantă acțiune a insulinei este inhibarea eliberării acizilor grași neesterificați. Primul eveniment în dezvoltarea stărilor diabetice sînt perturbările metabolismului gliceridelor care rezidă în principal în punerea în libertate a unei cantități mai mari de acizi grași din țesutul adipos și muscular.

Un alt hormon care împiedică depozitarea lipidelor în țesutul adipos și diminuează concentrația acizilor grași în plasma sanguină este *insulina*. Din contră, *adrenalina și noradrenalina* stimulează lipoliza trigliceridelor și determină o creștere a concentrației acizilor grași liberi în plasma sanguină. S-a demonstrat că acetilcolina stimulează incorporarea ^{32}P în

secțiunile de cortex cerebral (H o k i n). Se pare, de asemenea, că gonadele joacă un rol important în metabolismul lipidelor. Astfel, de exemplu, la păsări există o relație directă între hormonii estrogeni și metabolismul lipidic : în perioada „pontei" sîngele conține o cantitate de lipide de 10 ori mai mare decît în alte perioade ale vieții animalului. Această stare poate fi reprodusă dacă păsărilor femele tinere li se injectează hormoni estrogeni ovarieni.

Sinteza acizilor grași și a trigliceridelor (lipogeneza) este dependentă de precursorii lor — acidul acetic, acidul piruvic și glucoza — deoarece este însoțită de numeroase reacții de reducere care necesită prezența NADH + H^+ și NADPH + H^+ ca donori de hidrogen, cofactori care rezultă prin oxidarea directă a glucozo-6-fosfatului. În acest sens se explică și influența insulinei asupra lipogenezei ; acest hormon favorizează la nivelul țesutului adipos oxidarea directă a glucozei și deci producerea de NADPH + H^+ atît de necesar lipogenezei. Cea mai mare parte a acizilor grași utilizați pentru sinteza trigliceridelor necesită, pe de altă parte, prezența glicerolului care provine, de asemenea, din glucoză în cursul procesului de glicoliză.

Oxidarea grăsimilor la nivelul țesutului hepatic este puternic influențată de o serie de factori cunoscuți sub denumirea de *hepatotoxine* : cloro-

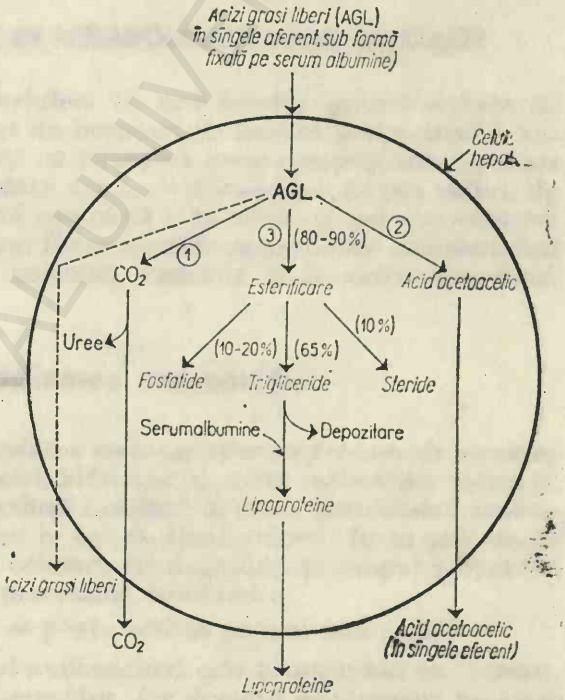


Fig. 18.21. — Bilanțul global al metabolismului acizilor grași liberi în ficat (modificat după D e s c o m p s și a l ț i i, 1967).

formul, tetraclorura de carbon, plumbul, fosforul, arsenul. Pe de altă parte, lipsa din alimentație a *factorilor lipotropi* (colina, metionina, glicocolul, inozitolul, lecitina etc.) sau prezența în acestea a unor mari concentrații de colesterol are același efect : o diminuare sensibilă a oxidării lipidelor de

către celula hepatică, urmată de *infiltrația grasă a ficatului*. Infiltrarea grasă a ficatului a fost descrisă și pentru cazurile cînd alimentația este bogată în vitamine din grupa *B*, în glucide și grăsimi însă este săracă în proteine, în special, în acizi aminați care conțin sulf. Vitamina *E* și *factorul* S c h w a r z au o acțiune protectoare în cazul infiltrației grase a ficatului, maladie cunoscută și sub denumirea de *ciroză hepatică*.

O acțiune lipotropă are treonina, însă mecanismul este necunoscut. Se presupune că intervine în sinteza enzimelor care participă la anabolismul fosfatidelor sau la oxidarea acizilor grași. Unii autori au susținut că o acțiune lipotropă posedă și un factor necunoscut, localizat în pancreas, denumit *factor lipocaic*, care s-a dovedit că de fapt nu există, deoarece infiltrația grasă a ficatului observată în cazul animalelor pancreatectomizate poate fi combătută cu succes prin administrarea de enzime proteolitice *(tripsina, papaina, ficina)*.

Acțiunea factorilor reuniți sub denumirea de factori lipotropi se datorește în esență capacității lor de a dona grupările metil labile pentru realizarea biosintezei de colină, principalul factor lipotrop și pentru procesul transmetilării. Metabolismul acizilor grași în ficat este redat succint în figura 18.21.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

19

METABOLISMUL AMINOACIZILOR

19.1 PROCESE GENERALE ÎN METABOLISMUL AMINOACIZILOR

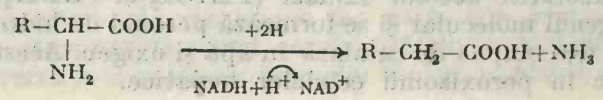
Aminoacizii sintetizaţi în celulele vii sînt folosiţi pentru sinteza de proteine specifice, de enzime şi de hormoni de natură polipeptidică sau proteică sau pot fi metabolizaţi cu formarea unor compuşi intermediari utilizaţi în sinteza bazelor azotate sau a altor compuşi. Ei pot suferi, de asemenea, o degradare oxidativă completă şi în acest caz servesc ca sursă energetică. În cele ce urmează vor fi expuse căile generale ale transformării aminoacizilor în organismele animale, vegetale şi în microorganisme.

19.1.1 Dezaminarea aminoacizilor

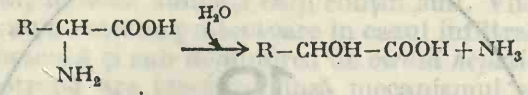
Acest proces rezidă în *degradarea aminoacizilor cu formare de amoniac şi acizii corespunzători* (α-cetoacizi, hidroxiacizi, acizi carboxilici saturaţi, acizi carboxilici nesaturaţi). Produşii rezultaţi în urma dezaminării aminoacizilor sînt ulterior metabolizaţi în celulă, fiind utilizaţi fie în procese de biosinteză a altor constituenţi celulari, fie degradaţi în scopul procurării energiei necesare întreţinerii proceselor biochimice.

Dezaminarea aminoacizilor se poate realiza pe mai multe căi :

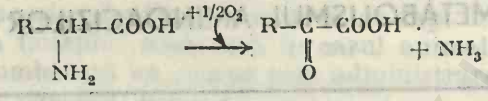
Dezaminarea reductivă cînd aminoacidul este transformat cu formare de amoniac şi a acidului corespunzător, iar donorul electronilor necesari reducerii este NADH+H$^+$:



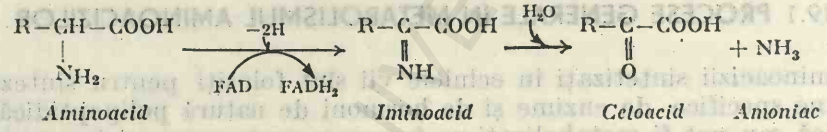
Dezaminarea hidrolitică în cursul căreia se formează amoniac și hidroxiacidul corespunzător aminoacidului:



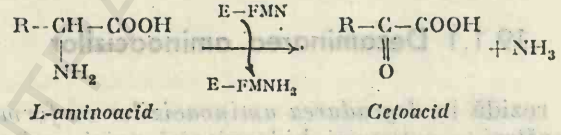
Dezaminarea oxidativă cînd se formează amoniac și cetoacidul corespunzător aminoacidului respectiv. Reacția globală poate fi redată astfel:



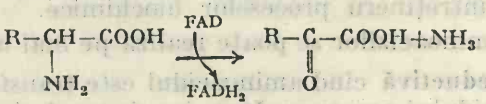
Acest tip de dezaminare constituie calea cea mai importantă de dezaminare atît pentru animale cît și pentru plante și este catalizată de enzimele denumite *oxidazele aminoacizilor*, care conțin în calitate de coenzimă FAD și posedă o înaltă specificitate de acțiune. Reacția de dezaminare oxidativă decurge în două faze: în prima fază are loc un proces de dehidrogenare cu formarea iminoacidului corespunzător și acceptorul de hidrogen este FAD oxidazei aminoacidului respectiv, iar în faza secundă are loc adiționarea elementelor apei și rezultă anoniac și cetoacidul corespounzător:



În numeroase organisme s-a pus în evidență existența a două tipuri de dehidrogenaze, ambele flavoproteine, dar care se deosebesc prin gruparea lor prostetică. Un tip de oxidază este specific pentru *L*-aminoacizi și denumit *L-aminoacid oxidază* și este localizat în reticulul endoplasmatic:



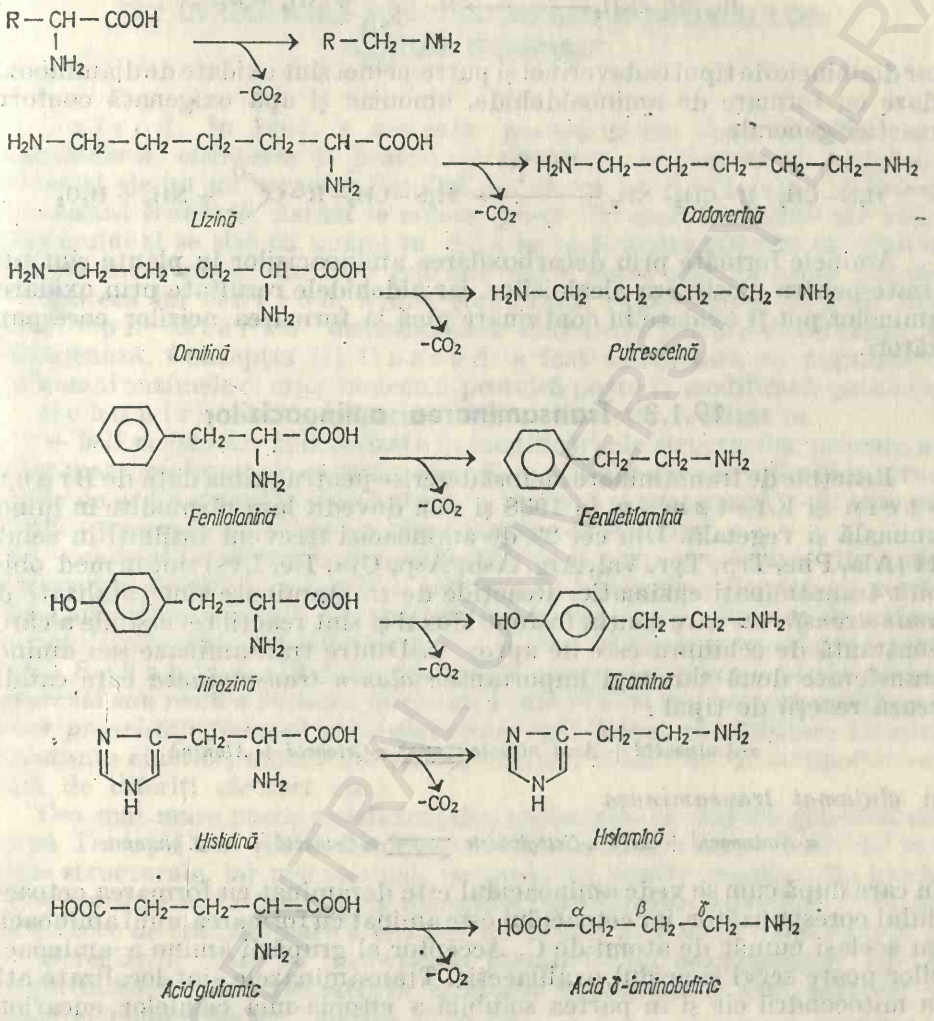
iar alt tip de oxidază este specific pentru *D*-aminoacizi și denumit *D-aminoacid oxidază*. Conține în calitate de coenzimă FAD și este localizat în microzomii celulelor hepatice:



Flavinnucleotidele acestor oxidaze ($FMNH_2$ și $FADH_2$) reacționează direct cu oxigenul molecular și se formează peroxid de hidrogen care este la rîndul său descompus de catalază în apă și oxigen. Acest proces enzimatic are loc în peroxizomii celulelor hepatice.

19.1.2 Decarboxilarea aminoacizilor

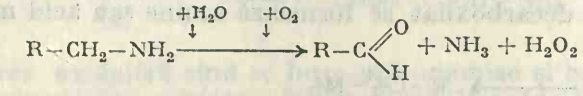
Procesul este catalizat de enzime specifice denumite *decarboxilazele aminoacizilor* care conţin în calitate de coenzimă *fosfopiridoxal.* În funcţie de aminoacidul decarboxilat se formează amine sau acid monocarbonic :



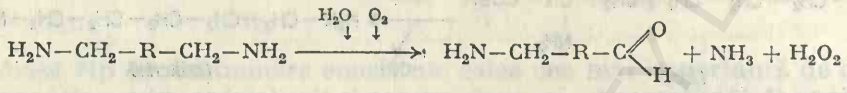
Aminele care se formează în cursul proceselor de decarboxilare posedă proprietăţi farmacodinamice (histamina, tiramina) şi îndeplinesc roluri fiziologice importante, de exemplu, acidul γ-aminobutiric sau sînt substanţe toxice deosebit de puternice. În mod normal în cursul procesului de putrefacţie se formează numeroase amine prin decarboxilarea aminoacizilor de către microorganisme. Aceste amine fac parte din *grupul ptomainelor.* Procesele de intoxicare în cazul consumului unor alimente alterate se explică prin prezenţa în acestea a aminelor toxice. În plante aminele toxice

49—c. 636 13

se pot forma cînd condiţiile de cultură sînt nefavorabile, însă acumularea lor nu poate fi considerată că s-ar datora faptului că sînt degradate oxidativ. Monoaminele sînt degradate de *monoaminooxidaze* cu formare de aldehide, amoniac şi apă oxigenată:



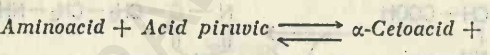
iar diaminele de tipul cadaverinei şi putresceinei sînt oxidate de diaminooxidaze cu formare de aminoaldehide, amoniac şi apă oxigenată conform reacţiei generale:



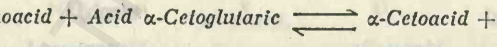
Aminele formate prin decarboxilarea aminoacizilor în plante sînt utilizate pentru biosinteza alcaloizilor, iar aldehidele rezultate prin oxidarea aminelor pot fi oxidate în continuare pînă la formarea acizilor corespunzători.

19.1.3 Transaminarea aminoacizilor

Reacţiile de transaminare au fost descrise pentru prima dată de B r a u n s t e i n şi K r i t z m a n în 1938 şi s-au dovedit larg răspîndite în lumea animală şi vegetală. Din cei 22 de aminoacizi frecvent întîlniţi în celulă 11 (Ala, Phe, Trp, Tyr, Val, Arg, Asn, Asp, Cys, Ile, Lys) sînt în mod obişnuit transaminaţi enzimatic. Reacţiile de transaminare sînt catalizate de *aminotransferaze* care conţin fosfopiridoxal şi sînt reacţii reversibile a căror constantă de echilibru este de aprox. 1. Dintre transaminaze sau aminotransferaze două sînt mai importante: *alanin transaminaza* care catalizează reacţii de tipul:



şi *glutamat transaminaza*



în care după cum se vede aminoacidul este dezaminat cu formarea cetoacidului corespunzător, iar cetoacidul este aminat cu formarea unui aminoacid cu acelaşi număr de atomi de C. Acceptor al grupării amino a aminoacizilor poate servi şi acidul oxalilacetic. Transaminazele sînt localizate atît în mitocondrii cît şi în partea solubilă a citoplasmei celulelor eucariote şi rolul lor fizologic este diferit (v. cap. 6). Mecanismul transaminării este descris în capitolul 8.

19.1.4 Transamidinarea şi transmetilarea aminoacizilor

Transamidinarea şi transmetilarea sînt procese enzimatice întîlnite rar şi în cursul lor se formează, de exemplu, *creatina*, *carnitina*, *ornitina*, *canava-*

lina și *canavanina*. Transamidinazele au fost evidențiate în rinichi, ficat, pancreas și folosesc ca substrat *arginina*. Metiltransferazele sînt răspîndite în diverse țesuturi și utilizează ca sursă de grupări metil *S-adenozilmetionina*

19.2 DEREGLĂRILE METABOLISMULUI AMINOACIZILOR. NOȚIUNI GENERALE

Garrod, în 1905, a semnalat pentru prima dată că *albinismul, alcaptonuria, cistinuria și pentozuria sînt erori congenitale ale metabolismului* și ele au un caracter familial, iar *cauza lor rezidă într-o deficiență enzimatică ereditară*. Astăzi se cunosc peste 175 erori înnăscute ale metabolismului și se știe că numai în SUA se nasc anual 250 000 de copii cu defecte metabolice, din care cea mai mare parte sînt de ordin genetic.

Ipoteza lui Garrod a fost confirmată experimental în anul 1952 cînd Von Gierke demonstrează deficiența glucozo-6-fosfatazei în glicogenoză. Concepția lui Garrod a fost completată cu noțiunea că nu numai enzimele ci orice moleculă proteică poate fi modificată patologic.

Schapira (1975) împarte bolile cu caracter ereditar în :

— *boli moleculare* concretizate în modificări ale structurilor primare ale unor macromolecule de natură proteică, modificări care se reflectă în structurile de ordin superior ale acestora — terțiară și cuaternară — și care pot explica procesele patologice a căror cauză o constituie ;

— *anomalii ereditare*, care se reflectă asupra părții prostetice, vitaminice sau asupra modului de legare a acestora cu apoenzima (partea proteică), din care cauză ele pot fi caracterizate ca *anomalii vitamino-dependente* și pot fi corectate pe cale terapeutică. Din această categorie fac parte după Schapira (1975) și *anomaliile enzimatice concretizate* în *absența aparentă sau reală a enzimei, micșorarea cantității ei în țesut sau modificarea unor proprietăți fizico-chimice ale enzimei* (pH optim, sensibilitate termică, constante cinetice, mobilitate electroforetică, modificări de comportament față de diferiți efectori etc.).

Cea mai mare parte a deficiențelor enzimatice de natură genetică sînt după Dreyfus (1975) datorate unei mutații punctiforme la nivelul unei gene structurale, iar mecanismele responsabile pentru modificările biochimice constau în instabilitatea moleculei, modificarea centrului activ sau în defecte de transformare a enzimei survenite, de regulă, după sinteza ei.

Dereglările care se întîlnesc în metabolismul aminoacizilor sînt în majoritatea lor concretizate în creșterea concentrației aminoacizilor în sînge și eliminarea lor sporită în urină.

Aminoaciduria este starea patologică caracterizată prin *prezența în urină a unuia sau a mai multor aminoacizi în cantități mult mai mari decît cele întîlnite în mod obișnuit* la indivizii normali. Omul adult elimină în 24 de ore aproximativ 3 g de amioacizi (peste 1 g pe cale urinară, sub formă liberă și circa 2 g sub formă conjugată). Cantitatea de aminoacizi eliminată variază de la o zi la alta, de la individ la individ și este în funcție de dietă, modificări fiziologice, diferențe genetice, vîrstă, climat etc. Creșterea ponderii proteinelor în alimentație este, de regulă, însoțită de o sporire de 2—3 ori

a excreției de diferiți aminoacizi individuali; în perioada de sarcină sînt eliminați pe cale urinară în cantități mari numai histidina și treonina.

După natura mecanismului care stă la baza aminoaciduriilor acestea se împart în *aminoacidurii de revărsare*, care apar ca urmare a unui defect al metabolismului intermediar, ceea ce are drept consecință creșterea cantității unui aminoacid sau a mai multor aminoacizi în plasma sanguină și imposibilitatea resorbției lor la nivelul tubilor renali și *aminoacidurii renale* cauzate de reabsorbția defectuoasă a aminoacidului sau a mai multor aminoacizi din filtratul glomerular, ca urmare a unei boli ereditare, a excesului de medicamente nefrotoxice sau a intoxicațiilor acute, de exemplu, a intoxicării cu plumb.

Unele cazuri de aminoacidurii renale sînt datorate unei dereglări nespecifice a transportului aminoacizilor și condiționate de o funcționare defectuoasă a tubulilor renali în transportul aminoacizilor, acidului uric, glucozei, electroliților, de capacitatea rinichilor de a concentra și acidifia urina. Aceste aminoacidurii sînt descrise sub diverse denumiri: *sindrom* Lignac-Fanconi, *sindrom* Fanconi *ereditar*, *sindrom* Fanconi *dobîndit* și, de regulă, sînt dereglări metabolice mult mai complexe însoțite de acidoze cronice, glucozurii renale, rahitism rezistent la vitamina *D*, poliurii, hipocalcemii, hipofosfatemii, aminoaciduric generalizată etc. De aceea în cele ce urmează vor fi menționate numai dereglările metabolice genetice, bine studiate și caracterizate din punct de vedere biochimic.

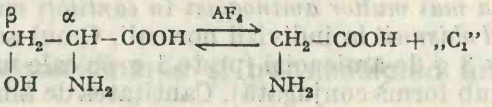
Numărul aminoacidopatiilor ereditare cunoscute în 1970 era de 40, majoritatea lor (62%) fiind însoțite de deficiențe mintale care pot fi prevenite sau tratate, dacă sînt depistate în faza incipientă, printr-un regim alimentar adecvat în care este suprimată sursa aminoacidului care determină boala sau printr-o dietă săracă în proteine. Alte deficiențe enzimatice care au drept rezultat apariția unor aminoacidopatii sînt tratate prin administrarea de vitamine hidrosolubile care îndeplinesc rolul de coenzime, de exemplu, vitaminele B_6, B_{12}, biotina, niacina etc.

În acest capitol aminoacidopatiile vor fi descrise împreună cu procesele metabolice (anabolismul și catabolismul) ale fiecărui aminoacid în parte.

19.3 METABOLISMUL PRINCIPALILOR AMINOACIZI NEESENȚIALI

19.3.1 Metabolismul glicocolului

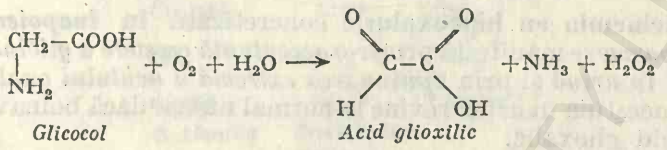
Biosinteza glicocolului se realizează din serină printr-o reacție enzimatică catalizată de *serin hidroximetil transferază*, în prezența Mn^{2+} și a piridoxal fosfatului și decurge cu formare de fragmente monocarbonice „C_1", după reacția*:



* Formulele structurale ale acizilor folici sînt redate în capitolul 8 împreună cu mecanismele reacțiilor la care aceștia participă.

Acceptorul grupărilor „C_1" este acidul tetrahidrofolic (AF_4) care trece *în acid N^5, N^{10}-metilentetrahidrofolic.* Probabil, că în timpul reacției enzimatice atomul de C al se inei este transferat acidului tetrahidrofolic după ce gruparea amino a serinei a format o bază S c h i f f cu fosforpiridoxalul. Baza S c h i f f este ulterior hidrolizată cu formare de glicocol și acid N_5, N_{10}-metilentetrahidrofolic.

Catabolismul glicocolului. Glicocolul sub acțiunea *D-aminoacid oxidazei* este dezaminat și transformat în acid glioxilic, metabolit deosebit de activ :



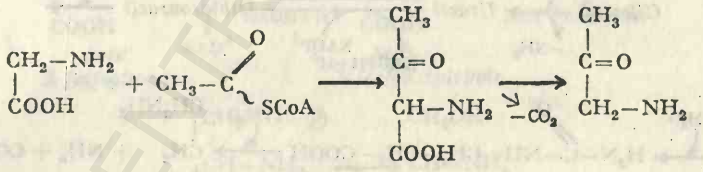
Glicocol *Acid glioxilic*

D-aminoacid oxidaza este o enzimă deosebit de activă în ficat și rinichi (în citoplasma celulară unde are ca grupare prostetică FAD), precum și în peroxizomii renali, hepatici și din creier. Rolul ei în țesuturile mamiferelor rămîne neclar, deoarece *D*-aminoacizii asupra cărora acționează pot avea numai proveniență exogenă, oarecum suspectă (!?) (peretele bacterian care este bogat în *D*-aminoacizi este hidrolizat și produsele absorbite la nivelul intestinului).

Glicocolul este un aminoacid *glico-* și *ceto-formator* (v. serina), iar oxidarea produsului lui de degradare, a acidului glioxilic cu formare de acid oxalic poate fi cauza oxaluriei primare, boală ereditară, caracterizată prin depunerea oxalatului de calciu în țesutul renal și în alte țesuturi.

Glicocolul participă în sinteza nucleului pirolic și deci a porfirinelor, la reacțiile care constituie ciclul lui S h e m i n.

Prin condensarea cu (acetil ~ SCoA) *glicocolul trece în acidul α-amino-β-cetobutiric,*



care prin decarboxilare se transformă în aminoacetonă, aceasta fiind transformată în țesuturi în acid piruvic.

Hiperglicinemia este o maladie ale cărei cauze rămîn necunoscute. Semnele ei clinice sînt *întîrzierea creșterii și dezvoltării psihice normale, atacuri de cetoză însoțite de vome, neutropenie și trombocitopenie, debilitate, somnolență, letargie, leșinuri.* Accentuarea semnelor clinice se produce printr-un consum exagerat de proteine bogate în leucină, izoleucină, treonină, metionină, valină. Din totalul cetonelor acetona formează 50% restul fiind 2-butanonă (metiletilcetonă), 2-pentanonă, 3-pentanonă, acetalde-

hidă, 2-hexanonă, a căror sursă de formare rămîne necunoscută. Administrarea de benzoat de sodiu reduce nivelul glicinemiei și glicinuriei, redresează leucocitele polinucleare sanguine. Cauzele acestei boli rămîn necunoscute.

Se cunoaște, de asemenea, și cazul glicinemiei neînsoțită de corpi cetonici; aceasta se datorește deficienței de activitate a glicinoxidazei care catalizează trecerea glicinei în glioxilat. Cantitatea de glicină este crescută în plasma sanguină și în urină, iar debilitatea mintală nu poate fi ameliorată prin instalarea unui regim alimentar sărac în glicocol și în serină. Cauzele acestei anomalii metabolice rămîn necunoscute.

Hiperglicinemia cu hipooxalurie concretizată în *înapoiere mintală, convulsii, spasme* se manifestă printr-o *accentuată creștere a glicinei în plasma sanguină și în urină* și prin *diminuarea extremă a acidului oxalic în urină.* Cantitatea acestuia în urină revine la normal numai dacă bolnavul primește în dietă acid glioxalic.

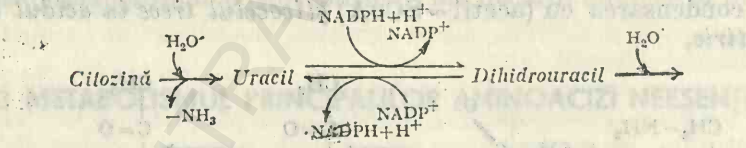
19.3.2 Metabolismul alaninei

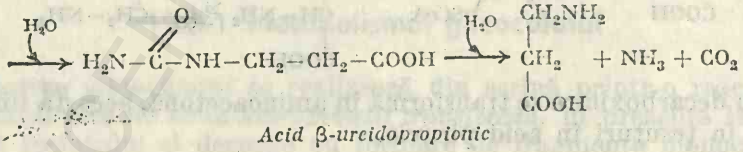
Biosinteza alaninei se realizează prin transaminarea acidului piruvic, după reacția:

Acid glutamic + Acid piruvic ⇄ Acid α-cetoglutaric + Alanină

Din microorganisme s-a izolat în stare cristalină enzima *aspartat β-decarboxilaza* (masă moleculară 760 000, enzimă oligomeră alcătuită din 12—14 subunități, fiecare conținînd un mol de fosfopiridoxal), care catalizează γ-decarboxilarea acidului aspartic cu formare de alanină.

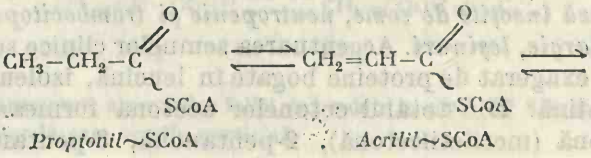
β-Alanina se biosintetizează la microorganisme prin α-decarboxilarea acidului aspartic pe cale enzimatică, iar în țesuturile mamiferelor poate rezulta pe două căi diferite: degradarea bazelor pirimidinice C și U după reacțiile (vezi formulele la pag. 857).



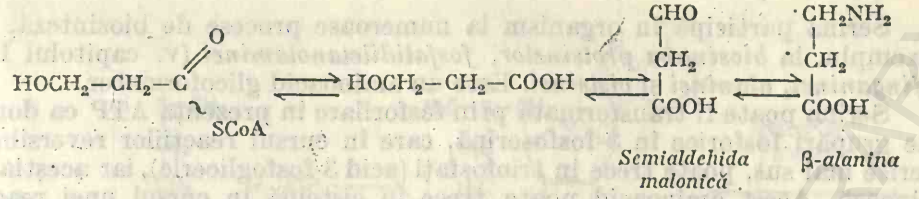


Acid β-ureidopropionic

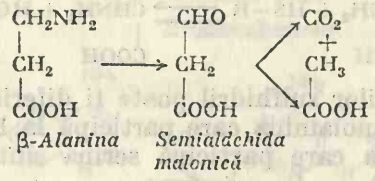
și din propionil ~ SCoA:



Propionil~SCoA *Acrilil~SCoA*



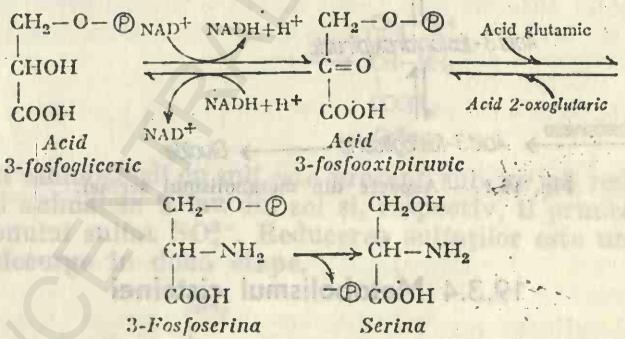
Catabolismul β-alaninei. β-Alanina este degradată la plante cu formare de dioxid de carbon și acid acetic:



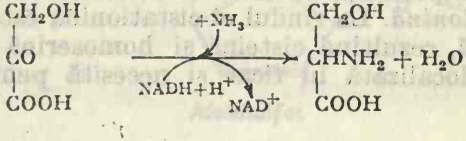
β-Alanina este utilizată în celule pentru sinteza *coenzimei A* și *acidului pantotenic.*

19.3.3 Metabolismul serinei

Biosinteza serinei. Atomii de carbon ai serinei provin, așa după cum s-a arătat în experiențele cu izotopi radioactivi, din acidul 3-fosfoglicerie, care este un produs intermediar al glicolizei. Acesta este dehidrogenat de *3-fosfoglicerat dehidrogenaza* ce conțin NAD^+ și transformat în 3-fosfoserină în cursul unei reacții de transaminare la care participă ca donor de grupări amino acidul glutamic. 3-Fosfoserina este defosforilată de *serin fosfatază* cu ormare de serină:

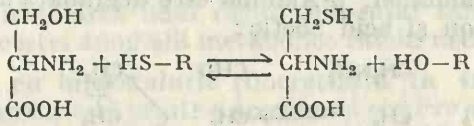


Serina este sintetizată în plante din glicocol și formaldehidă, cu participarea acizilor tetrahidrofolici (v. biosinteza glicocolului), precum și din acidul hidroxipiruvic în cursul unei reacții de aminare reductivă:



Serina participă în organism la numeroase procese de biosinteză, de exemplu, la *biosinteza proteinelor*, *fosfatidiletanolaminei* (v. capitolul 18), *sfinganinei*, *alaninei* și *cisteinei*. Este un aminoacid glicoformator.

Serina poate fi transformată prin fosforilare în prezența ATP ca donor de grupări fosforice în 3-fosfoserină, care în cursul reacțiilor reversibile, scrise mai sus, poate trece în triofosfați (acid 3-fosfogliceric), iar aceștia în glucoză. Acest aminoacid poate trece în cisteină în cursul unei reacții



în care donorul grupărilor sulfhidril poate fi diferit. Prin decarboxilarea serinei se formează etanolamina care participă la biosinteza fosfatidelor. Procesele metabolice la care participă serina sînt redate schematic în figura 19.1.

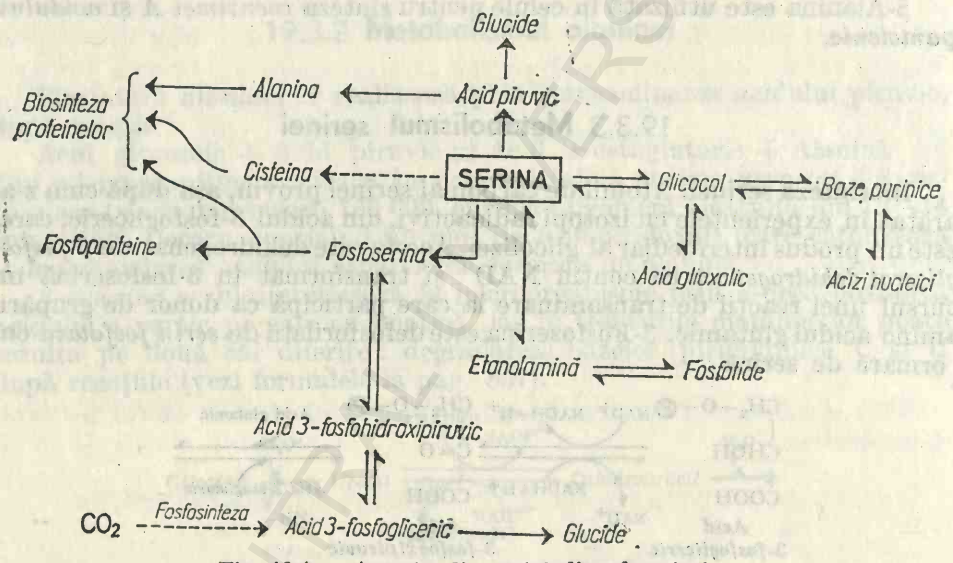


Fig. 19.1. — Aspecte din metabolismul serinei.

19.3.4 Metabolismul cisteinei

Anabolismul cisteinei. Cisteina este sintetizată în organism printr-un mecanism complex care are ca punct de plecare metionina. În cursul unei reacții de transmetilare realizată de *transmetilază* metionina trece în homocisteina care în prezența *cistationinsintetazei* condensează cu serina cu formare de *cistationină*. La rîndul ei cistationina este hidrolizată enzimatic de *cistationază*, rezultînd cisteină și homoserină (fig. 19.2). Cistation-γ-sintaza este localizată în ficat și necesită pentru activitatea ei fosfopiridoxal.

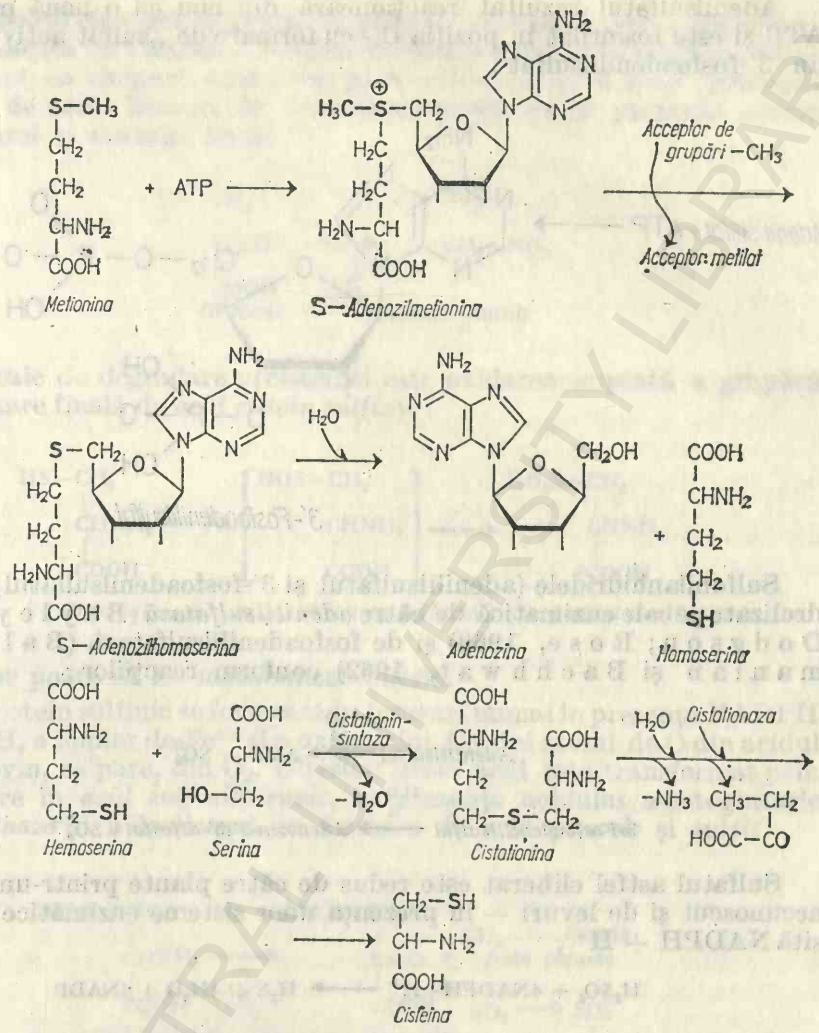
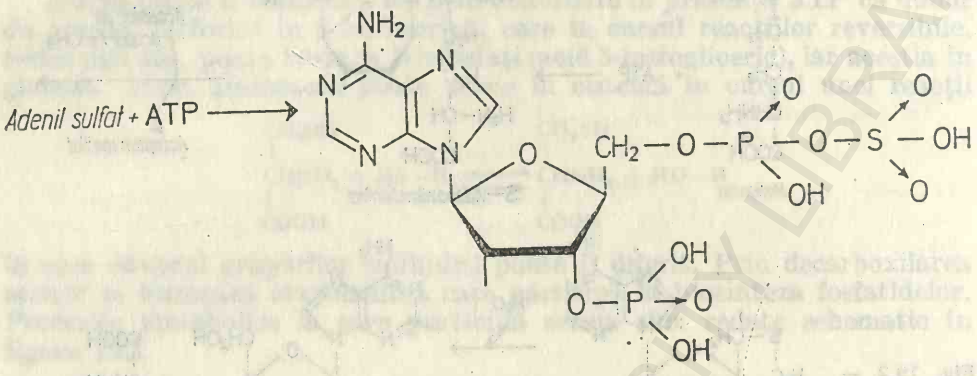


Fig. 19.2. — Biosinteza cisteinei.

Sulful din aminoacizii cu sulf este prezent sub formă redusă, cu toate că plantele și animalele îl iau din sol și, respectiv, îl primesc prin hrană sub forma ionului sulfat SO_4^{2-}. Reducerea sulfaților este un proces complicat care decurge în două etape.

Adenilsulfatul rezultat reacționează din nou cu o nouă moleculă de ATP și este fosforilat în poziția $C_{3'}$ cu formare de „sulfat activ" care este un 3'-fosfoadenililsulfat :



3'-Fosfoadenililsulfat

Sulfonilanhidridele (adenililsulfatul și 3'-fosfoadenilsulfatul) pot fi hidrolizate pe cale enzimatică de către *adenililsulfatază* (B a y l e y - W o o d, D o d g s o n; R o s e, 1969) și de fosfoadenililsulfatază (B a l a s u b r a m a n i a n și B a c h h w a t, 1962) conform reacțiilor :

$$\textit{Adenililsulfat} \xrightarrow{H_2O} AMP + SO_4^{2-}$$

$$\textit{3-Fosfoadenililsulfat} \xrightarrow{H_2O} \textit{Adenozin-3',5'-difosfat} + SO_4^{2-}$$

Sulfatul astfel eliberat este redus de către plante printr-un mecanism necunoscut și de levuri — în prezența unor sisteme enzimatice care necesită NADPH + H^+ :

$$H_2SO_4 + 4NADPH + H^+ \longrightarrow H_2S + 4H_2O + 4NADP$$

Cu ajutorul izotopilor radioactivi s-a demonstrat că la plante această reducere are loc mai intens la lumină, în cursul fotosintezei și decurge după schema :

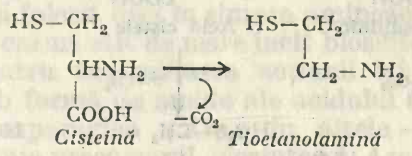
$$SO_4^{2-} \longrightarrow SO_3^{2-} \longrightarrow H_2S$$

Hidrogenul sulfurat rezultat este utilizat de levuri pentru biosinteza cisteinei din serină :

$$\begin{array}{l} CH_2OH \\ | \\ CHNH_2 \\ | \\ COOH \end{array} + H_2S \longrightarrow \begin{array}{l} CH_2{-}SH \\ | \\ CHNH_2 \\ | \\ COOH \end{array} + H_2O$$

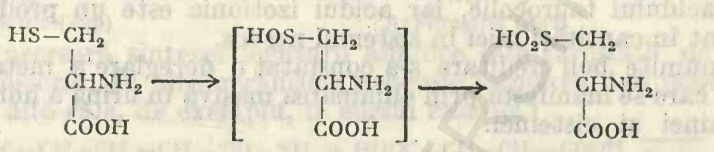
și se presupune că această sinteză are loc și la plantele superioare.

Catabolismul cisteinei. Degradarea cisteinei în organism prin decarboxilare este însoțită de formarea *tioetanolaminei*, compus biochimic deosebit de important ca element structural al *coenzimei A* și al ACP (proteinei purtătoare de acil). Reacția de decarboxilare are loc în prezența cistein decarboxilazei și decurge astfel:



Cisteină *Tioetanolamină*

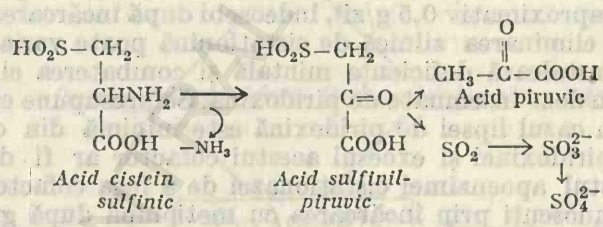
O altă cale de degradare a cisteinei este oxidarea treptată a grupării tiol cu formare finală de *acid cistein sulfinic*:



Cisteina *Acid cistein sulfonic* *Acid cistein sulfinic*

care ulterior poate să fie metabolizat diferit.

Acidul cistein sulfinic se formează în țesuturi numai în prezența NADPH sau a NADH, a ionilor de Fe^{2+} și a oxigenului. Cei doi atomi de O din acidul sulfinic provin, se pare, din O_2. Ulterior, acest acid este transformat prin transaminare în *acid sulfinilpiruvic*, în prezența acidului α-cetoglutaric și o *disulfinază* îl hidrolizează cu formare de acid *piruvic* și *sulfit*:

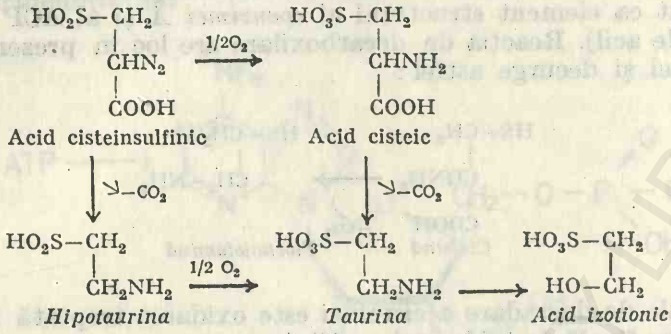


Acid cistein sulfinic *Acid sulfinil-piruvic*

Oxidarea sulfiților cu formare de SO_3^{2-} și SO_4^{2-} a fost decelată la microorganisme, plante și la mamifere și este realizată de o hemoproteină care conține molibden (masa moleculară 115 000).

Ionii de SO_4^{2-} rezultați sînt fie eliminați ca atare pe cale urinară, fie utilizați de organism pentru biosinteza *3'-fosfoadenozil-5'-fosfosulfatului* în cursul unei reacții enzimatice catalizate de *ATP sulfurilază* și *adenozin-5'-fosfosulfat-3'-fosfokinază*, care a fost izolată din levuri și din ficat și necesită prezența ionilor de Mg^{2+}. Produsul rezultat este utilizat pentru esterificarea fenolilor, alcoolilor și polizaharidelor celulare. Sulful anorganic și esterii lui cu compușii de natură steroidică, hidroxiaromatici, oligo- sau polizaharidică reprezintă peste 80% din sulful total eliminat pe cale urinară.

Acidul cistein sulfinic poate fi degradat și pe cale oxidativă cînd produsul degradării lui finale este *taurina:*



Taurina se întîlnește în cantități însemnate în ficat unde participă la sinteza acidului taurocolic, iar acidul izotionic este un produs normal, identificat în cantități mici în sistemul nervos.

În anumite boli ereditare s-a constatat o dereglare a metabolismului cisteinei care se manifestă prin eliminarea masivă în urină a homocisteinei, cistationinei și cisteinei.

Homocistinuria — boală autosomală recesivă detectabilă la naștere, cu o incidență de 1/150 000 se instalează după fenilcetonurie datorită lipsei cistationin sintetazei și acumulării homocisteinei în lichidele biologice. Semnele clinice ale bolii sînt : deficiență mintală, convulsii, deformități ale scheletului, osteoporoză, complicații trombo-embolice, cataractă, eliminarea homocisteinei în urină (pînă la 300 mg/24 h).Tratamentul constă într-o dietă săracă în metionină și îmbogățită în cisteină și este eficace numai în fazele incipiente ale bolii.

Cistationinuria se caracterizează prin eliminarea masivă pe cale urinară a cistationinei (aproximativ 0,5 g/zi), îndeosebi după încărcarea cu metionină. La adulți eliminarea zilnică de cistationină poate varia între 500—1 300 mg ; se instalează deficiența mintală și combaterea ei s-a dovedit eficace numai cu doze însemnate de piridoxină. Se presupune că activitatea cistationazei, în cazul lipsei de piridoxină este minimă din cauza legării defectuoase a piridoxinei și excesul acestui cofactor ar fi de natură să corecteze defectul apoenzimei cistationazei de a lega cofactorul. Heterozigoții sînt recunoscuți prin încărcarea cu metionină după gradul de eliminare a cistationinei.

Cistinuria este descrisă la metabolismul aminoacizilor bibazici (pag. 795).

19.3.5 Metabolismul acidului aspartic și amidei lui — asparagina

Metabolismul acestui acid este strîns legat de numeroasele procese ale metabolismului intermediar, realizînd legătura între metabolismul proteinelor și glucidelor.

Acidul aspartic este sintetizat în cursul reacției :

Acid glutamic + Acid oxaloacetic $\rightleftharpoons$ *Acid aspartic + Acid α-cetoglutaric*

La plante acidul aspartic se poate forma și în cursul unui proces de aminare reductivă catalizat de *aspartat—amoniac liaza*:

$$HOOC-CH=CH-COOH + NH_3 \rightleftharpoons HOOC-CH_2-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-COOH$$

Amoniacul care reprezintă pentru plante o substanță toxică este astfel făcut inofensiv și folosit deci în sinteza aminoacizilor. Cantitatea lui în plante este în unele cazuri atît de mare încît biosinteza acidului aspartic nu este suficientă pentru neutralizarea acțiunii lui toxice. Excesul de amoniac este legat sub formă de amide ale acidului *Glu* și *Asp*, în unele plante predominînd asparagina *(Asn)* în altele — glutamina *(Gln)*. Acidul aspartic constituie precursorul biosintezei *Asn* într-o reacție enzimatică catalizată de asparagin sintetaza:

$$HOOC-CH_2-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-COOH + NH_3 + ATP \longrightarrow HOOC-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-CH_2-CONH_2 + ADP + H_3PO_4$$

Acid aspartic (Asp) — *Asparagina* (Asn)

Energia necesară sintezei legăturii amidice este furnizată de acidul adenozintrifosforic. În alte organisme vegetale formarea Asn poate să se realizeze pe altă cale, de exemplu, în cursul reacției:

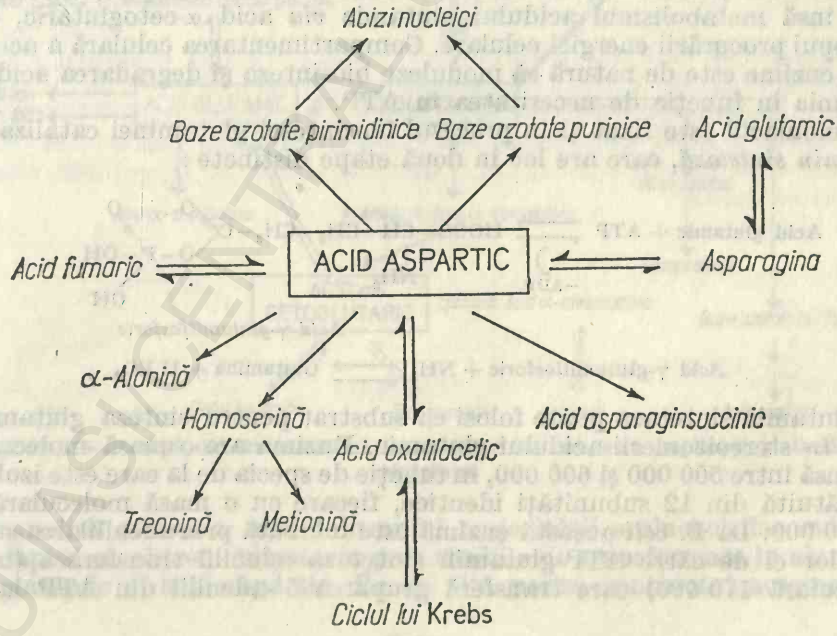
$$HOOC-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-CH_2-CH_2-CO-NH_2 + HOOC-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-CH_2-COOH \rightleftharpoons$$

Amida acidului glutamic — Acid aspartic

$$HOOC-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-CH_2-CH_2-COOH + HOOC-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-CH_2-CO-NH_2$$

Acid glutamic — *Amida acidului aspartic*

Rolul îndeplinit în metabolismul intermediar de Asp și Asn poate fi redat schematic astfel:



19.3.6 Metabolismul acidului glutamic și amidei lui — glutamina

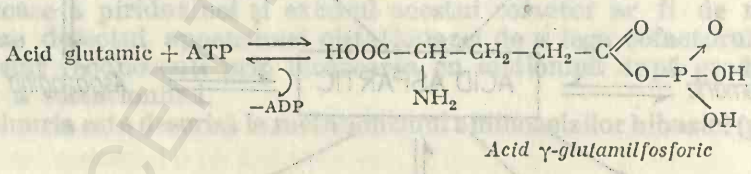
Acidul glutamic și amida lui, *glutamina*, îndeplinesc în organismele vii un rol deosebit de important *participînd la reacțiile de transaminare nu numai a cetoacizilor dar și a altor compuși și deci la biosinteza unui număr relativ mare de substanțe celulare.* Acidul glutamic face, de asemenea, legătura cu metabolismul glucidelor deoarece acidul α-cetoglutaric rezultat în cursul proceselor de transaminare este produsul intermediar al ciclului K r e b s. În același timp acidul glutamic este utilizat în celulă pentru *biosinteza bazelor azotate purinice, a glucozaminei, prolinei, ornitinei, glutationului, vitaminelor din grupul acidului folic, a acidul γ-aminobutiric, amidelor* etc.

Biosinteza acidului glutamic se realizează din amoniac, cantități echimolare de NADPH și acid α-cetoglutaric în prezența enzimei *L-glutamat dehidrogenaza* :

$$\text{Acid } \alpha\text{-cetoglutaric} + NH_3 + NADPH + H^+ \rightleftharpoons \text{Acid glutamic} + NADP^+$$

Acest proces de fixare a azotului este deosebit de important pentru metabolismul azotului la microorganisme și la plante ; el se întîlnește și la animale însă mecanismul lui biochimic rămîne necunoscut. Amoniacul utilizat în această reacție poate rezulta fie din amidele acizilor monoaminodicarboxilici, fie chiar din acidul glutamic care a fost dezaminat oxidativ. Glutamat dehidrogenaza, enzima care catalizează această reacție de fixare a azotului are o masă moleculară mare și nu necesită prezența unei grupări prostetice și este localizată în citoplasmă. Biosinteza ei la levuri și la *Neurospora sp.* este inhibată de prezența în mediu a acidului glutamic. În mitocondrii s-a descris o altă glutamat dehidrogenază NAD^+-dependentă, inhibată de ATP și stimulată de ADP care catalizează același proces, direcționînd însă metabolismul acidului glutamic *via* acid α-cetoglutaric, deci în scopul procurării energiei celulare. Compartimentarea celulară a acestor două enzime este de natură să moduleze biosinteza și degradarea acidului glutamic în funcție de necesitatea în ATP.

Amoniacul este fixat și în procesul biosintezei glutaminei catalizat de *glutamin sintetază*, care are loc în două etape distincte :



Acid γ-glutamilfosforic

$$\text{Acid } \gamma\text{-glutamilfosforic} + NH_3 \rightleftharpoons \text{Glutamina} + H_3PO_4$$

Glutamin sintetaza poate folosi ca substrat pentru sinteza glutaminei D- și L- stereoizomerii acidului glutamic. Enzima are o masă moleculară cuprinsă între 500 000 și 600 000, în funcție de specia de la care este izolată, și alcătuită din 12 subunități identice, fiecare cu o masă moleculară de cîte 50 000. La *E. coli* această enzimă este inhibată prin adenililarea subunităților ei de către ATP-glutamin sintetaza adenilil transferaza (masă moleculară 170 000) care transferă gruparea 5′-adenilil din ATP la un

hidroxil fenolic al unui rest de *Tyr* din catena polipeptidică a subunităților enzimei. Această reacție este catalizată de ionii de Mg^{2+}. O altă enzimă de deadenililare, cu o masă moleculară de aproximativ 130 000 este asociată cu ATP-glutamin sintetaza adenilil transferazei și catalizează hidroliza grupării 5′-adenilil, în prezența ionilor de Mn^{2+}, reactivînd enzima glutamin sintetaza.

Glutamin sintetaza poate deci exista în trei forme: o formă activă, o formă adenilată, cînd cele 12 subunități sînt adenililate prin legarea la fiecare subunitate a unui rest de acid 5′-adenilic și enzima nu este activă și o formă inhibată, cînd la situsurile allosterice ale celor 12 subunități sînt legate resturile unor inhibitori allosterici: glicocolul, alanina, AMP, CTP, triptofanul, histidina, carbanilfosfatul etc. (M e i s t e r, 1968; S t a d t m a n, 1966). Acest complicat proces de reglare a biosintezei glutaminei printr-o enzimă reglatoare deosebit de complexă este explicabil prin rolul important al acestui compus în reacțiile metabolismului intermediar (în centru, pe săgeata sub formă elipsoidală este figurată enzima glutamin sintetaza, fig. 19.3).

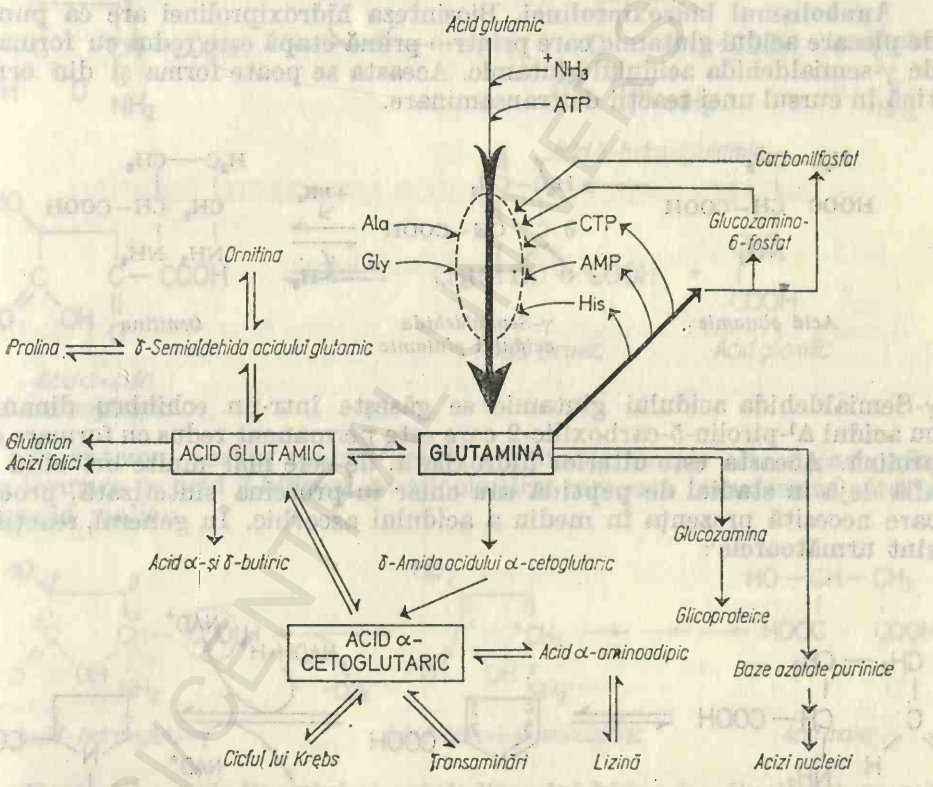


Fig. 19.3. — Reacții din metabolismul intermediar în care este implicată glutamin sintetaza.

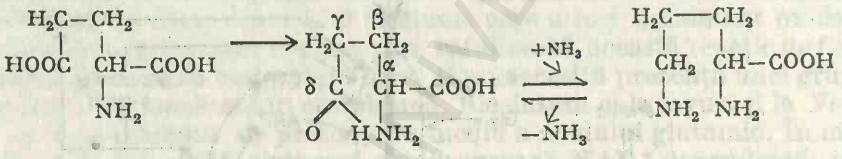
O analiză atentă a metabolismului majorității aminoacizilor evidențiază faptul că ei trec obligatoriu prin stadiile de transformare în alanină, acid glutamic și acid aspartic. Pe de altă parte, conținutul acestora —

Ala, Glu, Gln, Asp, Asn — în proteinele vegetale, de regulă, nu este inferior cifrei de 30% (uneori ajunge pînă la 50% din molecula proteinei, cum este de exemplu cazul gliadinei din cariopsele de grîu). Dacă se ia în considerare şi faptul că alţi aminoacizi sînt biosintetizaţi via *Glu* sau via *Asp* (v. mai departe) se constată că peste 60% din resturile aminoacizilor dintr-o moleculă proteică sînt rezultatul unor procese metabolice în care fixarea azotului şi transferul grupărilor amino ocupă locul central, iar acizii *Glu-* şi *Asn* şi amidele lor sînt principalii compuşi în acest proces. Rolul îndeplinit de glutamină în formarea carbamilfosfatului este descris la ciclul Krebs-Henseleit (pag. 822).

Acidul glutamic este utilizat în celulă pentru *biosinteza prolinei* şi *hidroxiprolinei.*

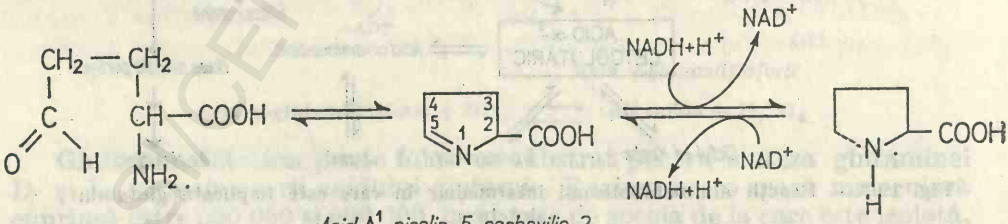
19.3.7 Metabolismul hidroxiprolinei

Anabolismul hidroxiprolinei. Biosinteza hidroxiprolinei are ca punct de plecare acidul glutamic care printr-o primă etapă este redus cu formare de γ-semialdehida acidului glutamic. Aceasta se poate forma şi din ornitină în cursul unei reacţii de transaminare.



Acid glutamic — *γ-Semialdehida acidului glutamic* — *Ornitina*

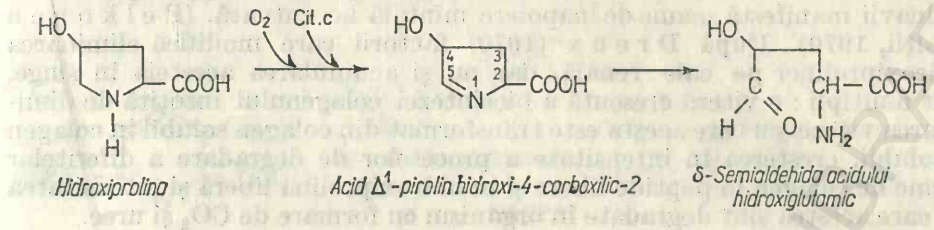
γ-Semialdehida acidului glutamic se găseşte într-un echilibru dinamic cu acidul Δ¹-pirolin-5-carboxilic-2 care este permanent redus cu formare de prolină. Aceasta este ulterior hidroxilată, de cele mai multe ori cînd se află deja în stadiul de peptidă sau chiar în proteina sintetizată, proces care necesită prezenţa în mediu a acidului ascorbic. În general, reacţiile sînt următoarele :



Acid Δ¹-pirolin-5-carboxilic-2

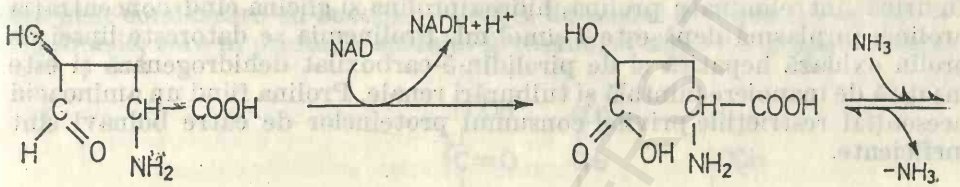
Catabolismul hidroxiprolinei. Hidroxiprolina este oxidată de hidroxiprolinoxidaza mitocondrială, în prezenţa oxigenului şi a citocromului *c*

cu formare de acid Δ^1-pirolin-5-hidroxi-4-carboxilic-2, acid care trece în γ-semialdehida acidului hidroxiglutamic :

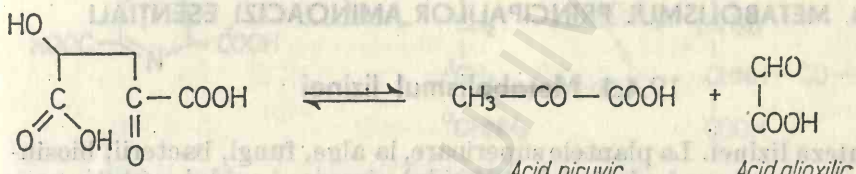


Hidroxiprolina — *Acid Δ^1-pirolin hidroxi-4-carboxilic-2* — *δ-Semialdehida acidului hidroxiglutamic*

Aldehida acidului hidroxiglutamic este dehidrogenată cu formare de acid γ-hidroxiglutamic, iar acesta prin transaminare trece în acid γ-cetoglutaric care este hidrolizat în cursul unei reacții de tip aldolazic cu formare de acid piruvic și acid glioxilic :

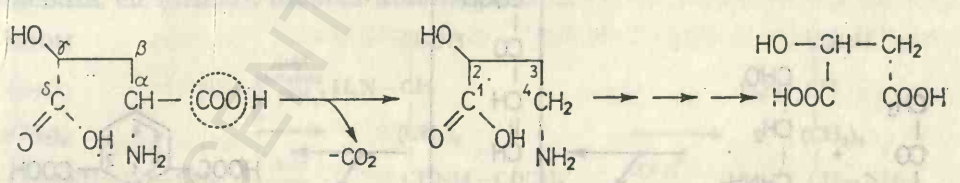


Acid δ-hidroxiglutamic



Acid α-ceto δ-hidroxiglutaric — *Acid piruvic* — *Acid glioxilic*

În sistemul nervos central acidul γ-hidroxiglutamic este decarboxilat cu formare de acid 2-hidroxi-4-aminobutiric care este transformat ulterior în acid malic :



Acid δ-hidroxiglutamic — *Acid 2-hidroxi-4-aminobutiric* — *Acid malic*

Deși căile anabolismului și catabolismului hidroxiprolinei sînt asemănătoare și în parte chiar comune se pare că în realitate ele sînt separate, deoarece au loc în regiuni diferite ale celulei.

Metabolismul hidroxiprolinei și eliminarea ei pe cale urinară poate furniza date importante despre bolile de colagen, bolile de țesut conjunctiv și de piele. În lipsa hidroxiprolinoxidazei cantitatea de hidroxiprolină serică

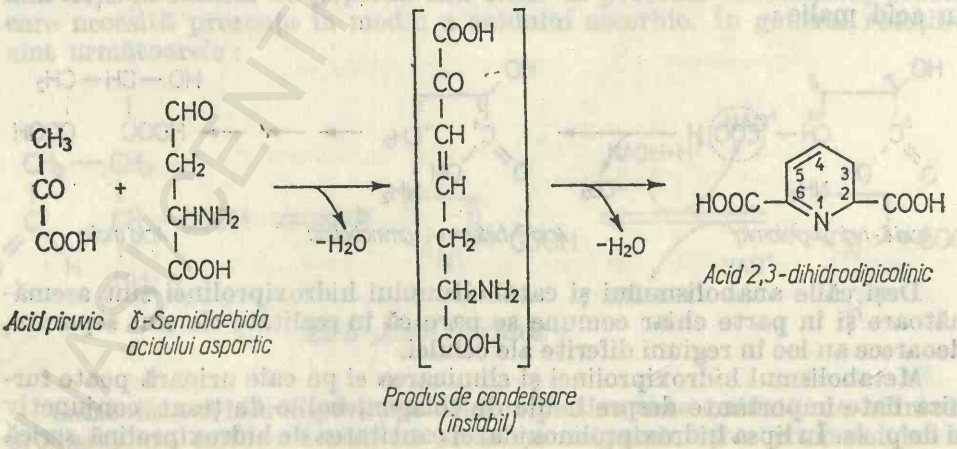
și urinară este mult crescută paralel cu un metabolism normal al prolinei. Aceste stări sînt cunoscute ca hidroxiprolinemie și hidroxiprolinurie. Bolnavii manifestă semne de înapoiere mintală accentuată. (P e l k o n e n și alții, 1970). După D r e u x (1970) factorii care modifică eliminarea hidroxiprolinei pe cale renală, dar nu și acumularea acesteia în sînge, sînt multipli : o viteză crescută a biosintezei colagenului însoțită de diminuarea vitezei cu care acesta este transformat din colagen solubil în colagen insolubil, creșterea în intensitate a proceselor de degradare a diferitelor forme de colagen în peptide libere și în hidroxiprolină liberă și intensitatea cu care acestea sînt degradate în organism cu formare de CO_2 și uree.

Hiperprolinemia *se întîlnește în nefritele ereditare și în hematurii.* În unele cazuri s-a precizat că hiperprolinemia este datorată deficienței oxidazei acidului Δ^1-pirolin-5′-carboxilic care are drept consecințe creșterea cantității de prolină și de acid Δ^1-pirolin-5′-carboxilic, derivatul ei oxidat. În urină sînt eliminate prolina, hidroxiprolina și glicina cînd concentrația prolinei în plasmă depășește 1 μmol/ml. Prolinemia se datorește lipsei de prolin oxidază hepatică și de pirolidin-5-carboxilat dehidrogenază și este însoțită de înapoiere mintală și tulburări renale. Prolina fiind un aminoacid neesențial restricțiile privind consumul proteinelor de către bolnavi sînt ineficiente.

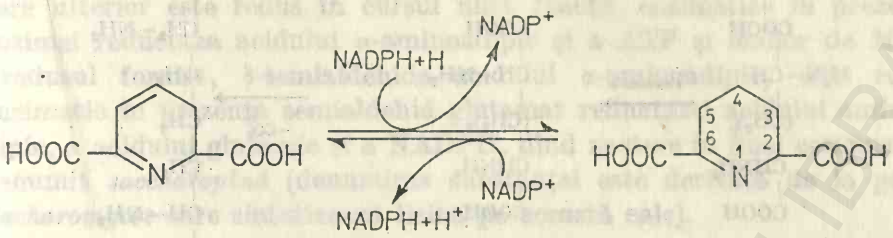
19.4. METABOLISMUL PRINCIPALILOR AMINOACIZI ESENȚIALI

19.4.1 Metabolismul lizinei

Biosinteza lizinei. La plantele superioare, la alge, fungi, bacterii, biosinteza lizinei se realizează plecînd de la acidul piruvic și acidul aspartic prin calea metabolică denumită *calea acidului diaminopimelic.* În cursul unei condensări aldol β-semialdehida acidului aspartic reacționează cu acidul piruvic, în prezența unei enzime de condensare, cu formare de *acid 2,3-dihidropicolinic*

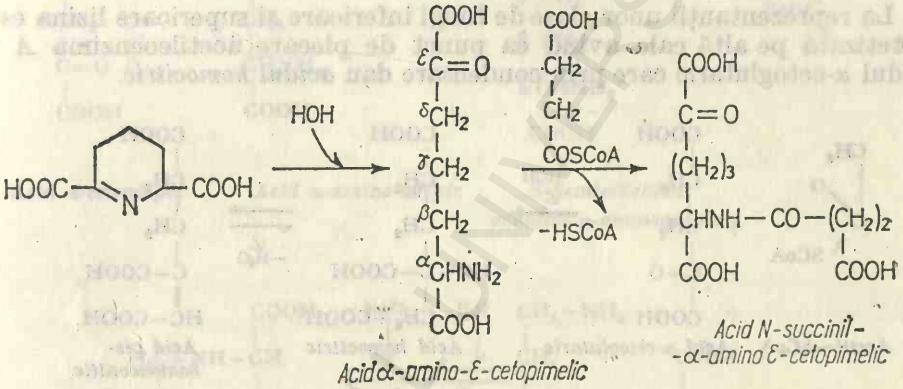


care în prezența unei reductaze, ce are în calitate de coenzimă NADPH este transformat în acid Δ^1-*piperidein-2,6-dicarboxilic*:



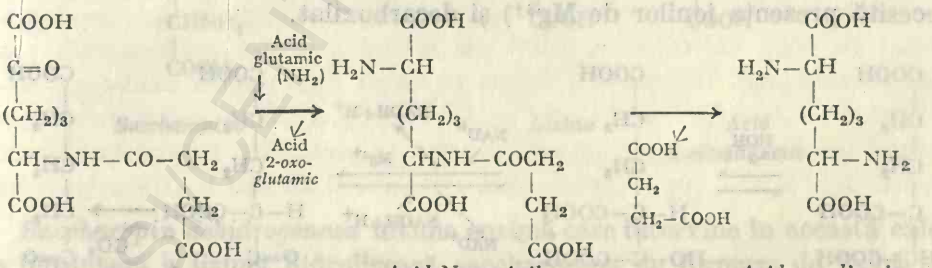
Acid 2,3-dihidrodipicolinic *Acid Δ^1-piperidein-2,6-dicarboxilic*

Acest acid este hidrolizat cu formare de acid α-amino-ε-cetopimelic, care prin condensare cu succinil ~ SCoA dă acidul N-succinil-α-amino-ε-cetopimelic, care în prezența acidului glutamic ca sursă de grupări amino



Acid α-amino-ε-cetopimelic *Acid N-succinil-α-amino ε-cetopimelic*

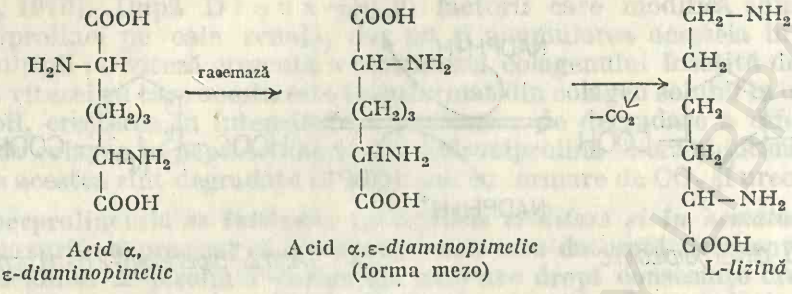
și a N-*succinil diaminopimelat-glutamatului* este transformat în acid N-succinil-α, ε-diaminopimelic care este deacilat de N-succinildiaminopimelat-deacilază cu formare de *acid diaminopimelic*.



Acid N-succinil-α, ε-diaminopimelic *Acid α,ε-diamino-pimelic.*

Acidul α, ε-diaminopimelic este racemizat de o racemază și transformat în acid *mezo*-α, ε-diaminopimelic, care în prezența unei decarboxilaze

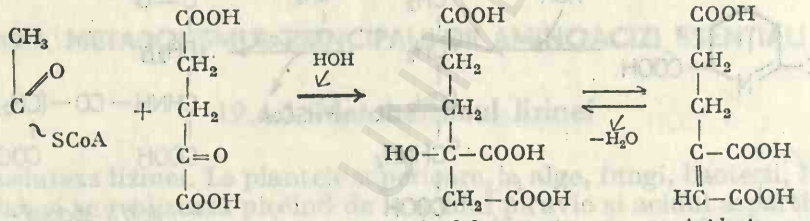
specifice (care necesită coenzima piridoxal fosfat) trece în 1-lizină. Reacţiile sînt următoarele :



Acid α, ε-diaminopimelic — Acid α,ε-*diaminopimelic* (forma mezo) — L-*lizină*

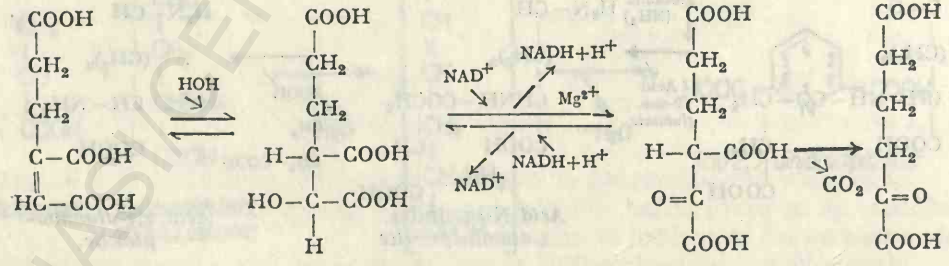
Biosinteza lizinei este controlată printr-un mecanism de retroinhibiţie, deoarece lizina rezultată poate inhiba reacţia de condensare a β-semialdehidei acidului aspartic cu acidul piruvic.

La reprezentanţii unor clase de fungi inferioare şi superioare lizina este sintetizată pe altă cale avînd ca punct de plecare acetilcoenzima *A* şi acidul α-cetoglutaric care prin condensare dau *acidul homocitric.*



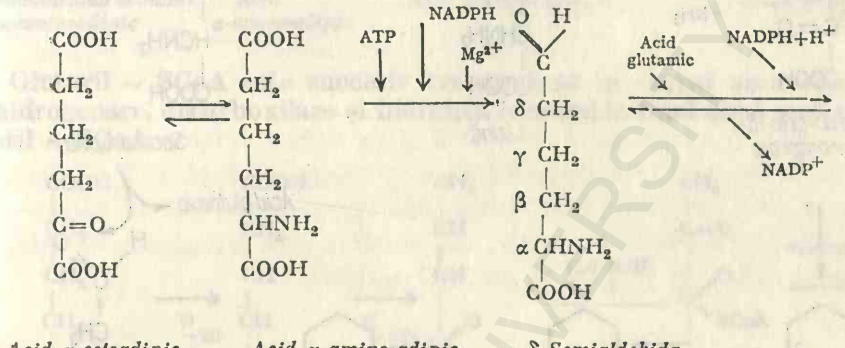
Acetil~SCoA — *Acid α-cetoglutaric* — *Acid homocitric* — *Acid cis-homoaconitic*

În prezenţa cishomoaconitazei acidul homocitric este deshidratat cu formare de acid *cis*-homoaconitic şi izomerizat în acid homoizocitric, ulterior dehidrogenat de homoizocitrat dehidrogenază (conţine NAD^+ şi necesită prezenţa ionilor de Mg^{2+}) şi decarboxilat.

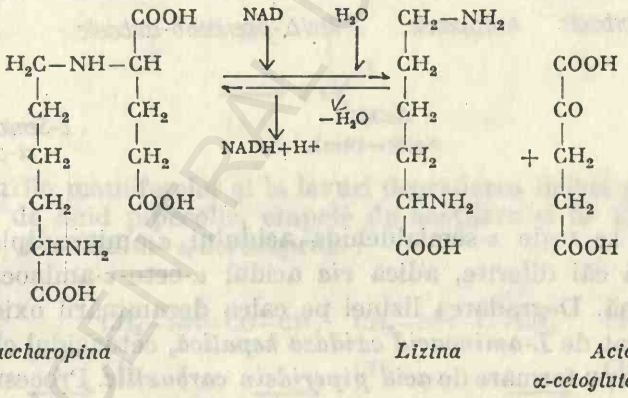


Acid cis-homoaconitic — *Acid homoizocitric* — *Acid oxaloglutaric* — *Acid α-cetoadipic*

Acidul α-ceto adipic rezultat este transaminat de enzima *α-amino-adipat — glutamat aminotransferaza* dînd naștere acidului α-aminoadipic, care ulterior este redus în cursul unei reacții enzimatice în prezența enzimei reductaza acidului α-aminoadipic și a ATP și ionilor de Mg^{2+}. Produsul format, δ-semialdehida acidului α-aminoadipic, este redus enzimatic în prezența semialdehid glutamat reductazei acidului aminoadipic, a acidului glutamic și a NADPH, dînd naștere în final compusului denumit *saccharopină* (denumirea substanței este derivată de la genul *Sacharomyces* care sintetizează lizina pe această cale).



Acid α-ceto adipic *Acid α-amino-adipic* *δ-Semialdehida acidului α-aminoadipic*

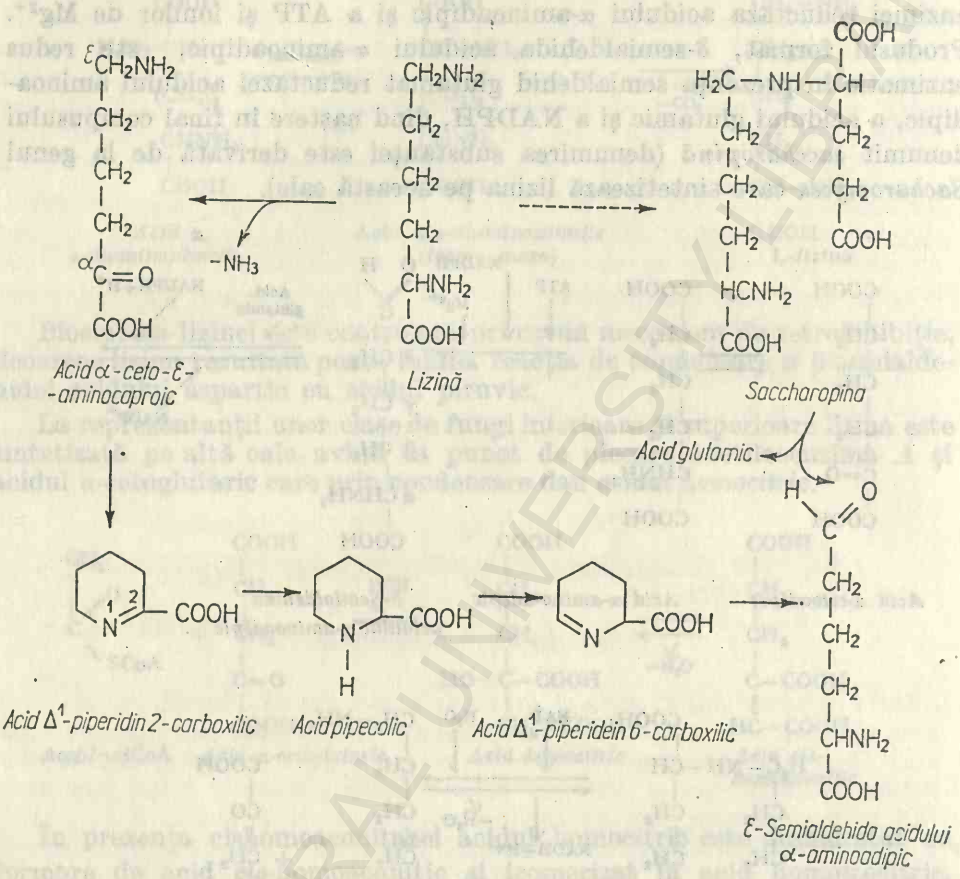


Saccharopina *Lizina* *Acid α-cetoglutamic*

Saccharopin dehidrogenaza ultima enzimă care intervine în această cale de biosinteză a lizinei hidrolizează saccharopina cu formare de lizină și acid α-cetoglutaric.

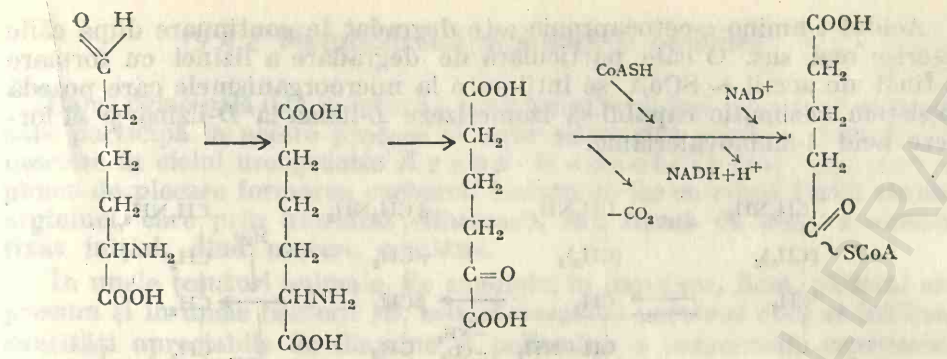
Catabolismul lizinei a fost descris prima dată pentru mitocondriile celulelor hepatice și parțial reproduce reacțiile inverse din calea de biosin-

teză a lizinei în care acidul aminoadipic ocupă un loc central. Schematic catabolismul acestui aminoacid poate fi redat astfel :



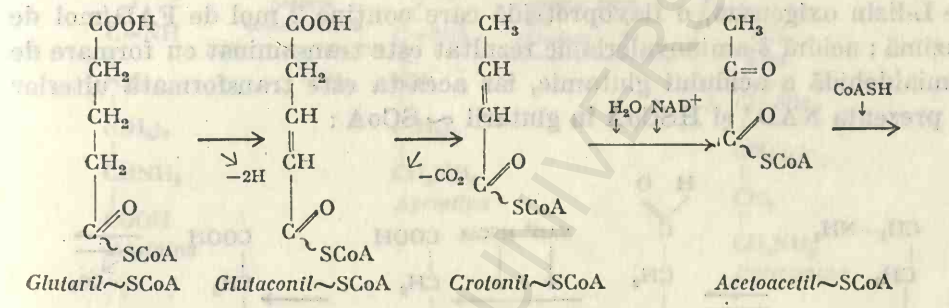
După cum se vede ε-semialdehida acidului α-aminoadipic se poate forma pe două căi diferite, adică *via* acidul α-ceto-ε-aminocaproic sau *via* saccharopină. Degradarea lizinei pe calea dezaminării oxidative este efectuată în ficat de *L-aminoacid oxidaza hepatică*, cetoacidul ciclizîndu-se în mod spontan cu formare de *acid piperidein carboxilic*. Procesul reducerii acestui acid la acid pipecolic necesită prezența NAD sau NADP sub formă redusă.

ε-Semialdehida acidului α-aminoadipic este oxidată într-o etapă următoare cu formare de acid α-aminoadipic, de o enzimă hepatică, în prezența ionilor de Mg^{2+} și a ATP. În continuare acidul α-aminoadipic este transaminat dînd acid α-cetoglutaric, care este decarboxilat pe cale oxidativă. Acest proces are loc în prezența CoASH și NAD oxidat.

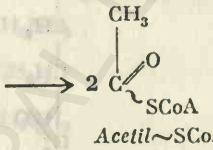


ε-Semialdehida acidului α-aminoadipic — *Acid α-aminoadipic* — *Acid α-cetoadipic* — *Glutaril∼SCoA*

Glutaril ∼ SCoA este succesiv transformat în cursul unor reacţii de dehidrogenare, decarboxilare şi hidroliză formînd în final două molecule de acetil ∼ SCoA.

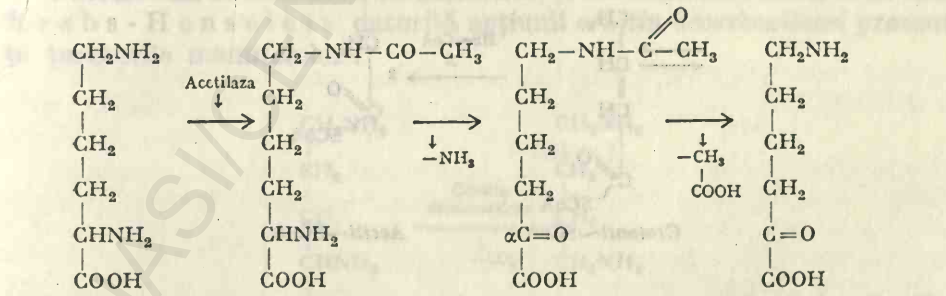


Glutaril∼SCoA — *Glutaconil∼SCoA* — *Crotonil∼SCoA* — *Acetoacetil∼SCoA*



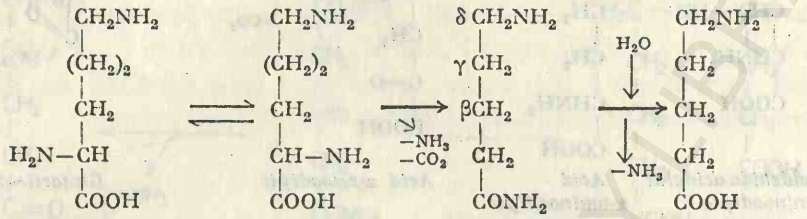
Acetil∼SCoA

În ţesuturile mamiferelor şi la levuri degradarea lizinei parcurge, pînă la formarea de acid pipecolic, etapele de acetilare şi de apariţie a unei ε-acetamide a acidului α-cetocaproic :

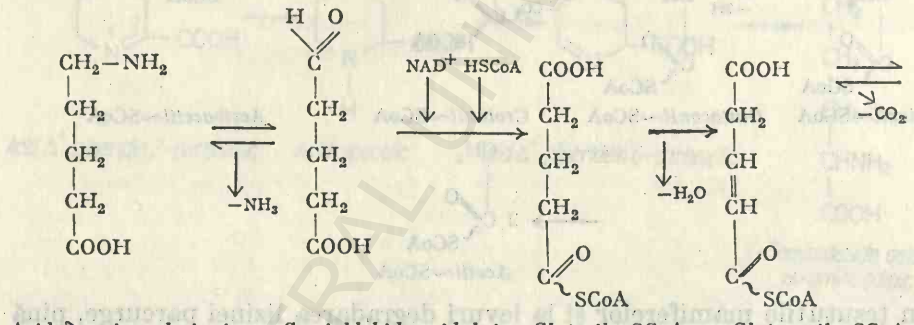


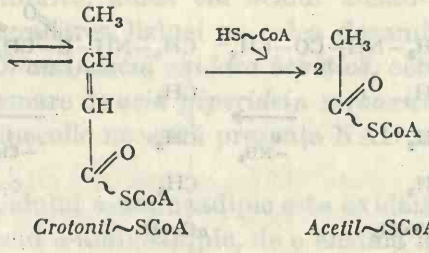
Lizină — *ε-N-Acetillizină* — *ε-Acetamida acidului α-cetocapronic* — *Acidul ε-amino-α-cetocapronic*

Acidul ε-amino-α-cetocapronic este degradat în continuare după căile descrise mai sus. O cale particulară de degradare a lizinei cu formare în final de acetil ~ SCoA se întîlnește la microorganismele care posedă un sistem enzimatic capabil să izomerizeze *L*-lizina la *D*-lizină și să formeze acid δ-aminovalerianic.



Procesele de dezaminare oxidativă și de decarboxilare sînt catalizate de L-lizin oxigenaza, o flavoproteidă care conține 2 mol de FAD/mol de enzimă; acidul δ-aminovalerianic rezultat este transaminat cu formare de semialdehidă a acidului glutamic, iar aceasta este transformată ulterior în prezența NAD^+ și HSCoA în glutaril ~ SCoA:



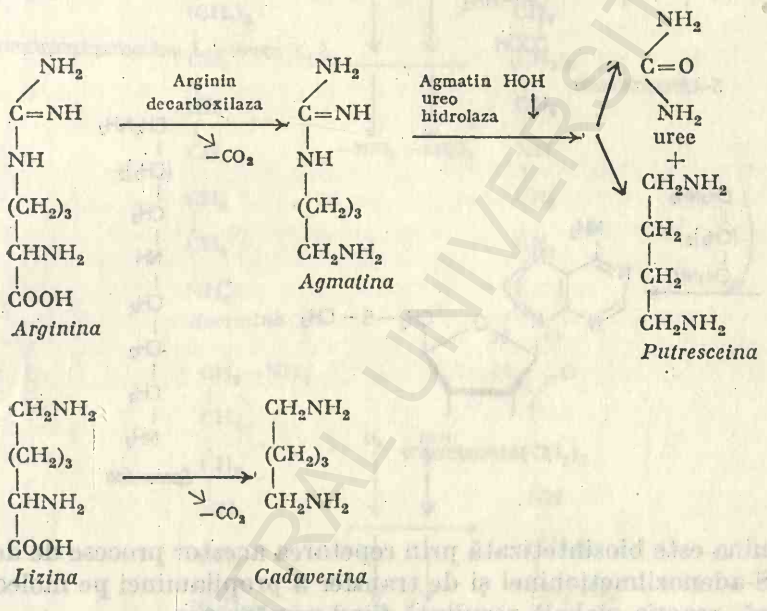


Produsul final al transformărilor ulterioare ale glutaril ~ SCoA este tot acetil ~ ScoA.

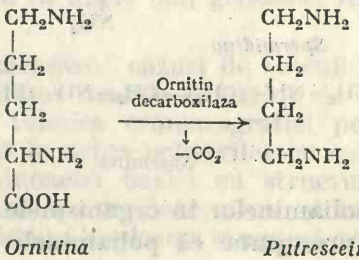
19.4.2 Metabolismul argininei și ornitinei

Calea principală de biosinteză a ornitinei și argininei, precum și enzimele care participă la aceste procese al căror sediu sînt celulele animale sînt descrise în ciclul ureogenetic Krebs-Henseleit (pag. 822) și au ca punct de plecare formarea carbamil fosfatului, iar ca etapă finală sinteza argininei, care prin hidroliză elibercază, sub formă de uree, amoniacul fixat inițial, dînd naștere ornitinei.

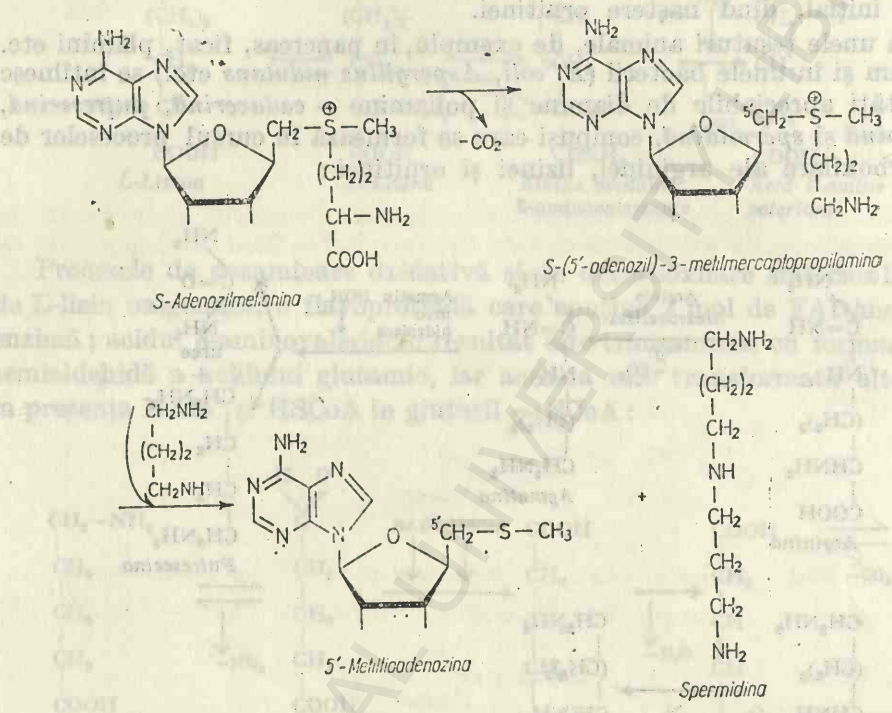
În unele țesuturi animale, de exemplu, în pancreas, ficat, plămîni etc. precum și în unele bacterii (*E. coli*, *Aspergillus nidulans* etc.) se întîlnesc cantități apreciabile de diamine și poliamine — *cadaverină*, *putresceină*, *spermină* și *spermidină*, compuși care se formează în cursul proceselor de decarboxilare ale argininei, lizinei și ornitinei:



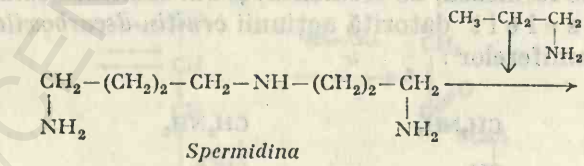
Putresceina se formează, de asemenea, și din ornitina rezultată în ciclul Krebs-Henseleit datorită acțiunii *ornitin-decarboxilazei* prezentă în țesuturile mamiferelor:

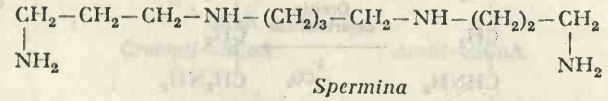


Putresceina rezultată în cursul acestor procese de decarboxilare este utilizată de celule pentru biosinteză de *spermidină* și *spermină* în cursul unor reacții enzimatice în care *S-adenozilmetionina* este sursa de atomi de C și de N ; într-o primă etapă S-adenozilmetionina este decarboxilată cu formare de S-adenozilmetilmercaptopropilamină, care apoi cedează putresceinei restul de propilamină și se transformă în metiltioadenozină.



Spermina este biosintetizată prin repetarea acestor procese de decarboxilare a S-adenozilmetioninei și de transfer a propilaminei pe molecula de spermidină, reacția globală rezultată fiind următoarea :

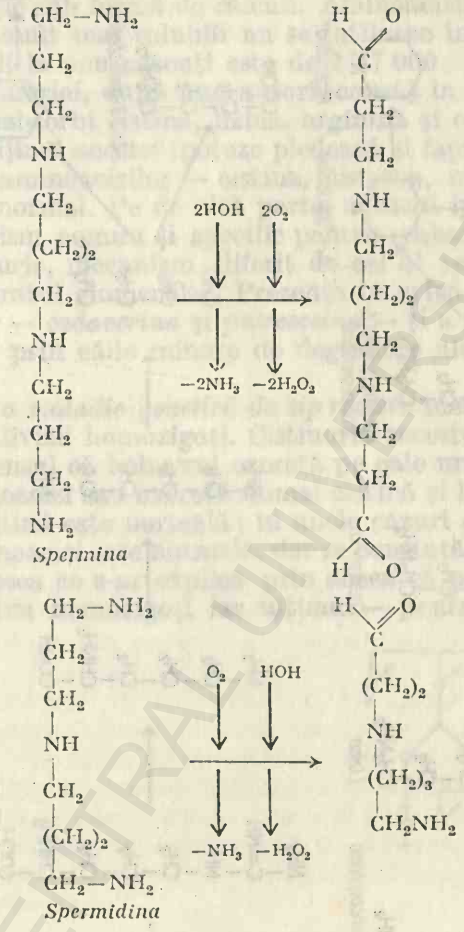




Rolul diaminelor și poliaminelor în organismele vii este divers și încă insuficient precizat. Se presupune că poliaminele servesc ca factori de

stabilizare a structurilor membranare, ca factori de creștere pentru unele microorganisme sau / și pentru menținerea structurii secundare a ribozomilor. La unele bacterii și virusuri poliaminele au fost identificate asociate în complexe cu DNA, dar rolul lor rămîne neprecizat.

În numeroase țesuturi mono- di- și poliaminele sînt dezaminate oxidativ de o metaloenzimă care conține cupru, iar produsele oxidării sînt amoniacul și apa oxigenată.



Lizina, arginina și ornitina au și alte căi minore de degradare în organism întîlnite îndeosebi în unele boli genetice, reunite sub denumirea de cistinurie.

Cistinuria. În numeroase cazuri de calculi renali s-a constatat că pacienții elimină continuu masive cantități de cistină pe cale urinară. Ulterior, folosindu-se tehnica cromatografiei pe hîrtie (S t e i n, 1953) s-a evidențiat faptul că în urina bolnavilor cu calculi renali sînt prezente mari cantități de aminoacizi bazici cu structură chimică apropiată — lizină, arginină, ornitină — excretate zilnic și în cursul întregii vieți în timp ce concentrația cistinei în plasma sanguină este normală. Semnificativ

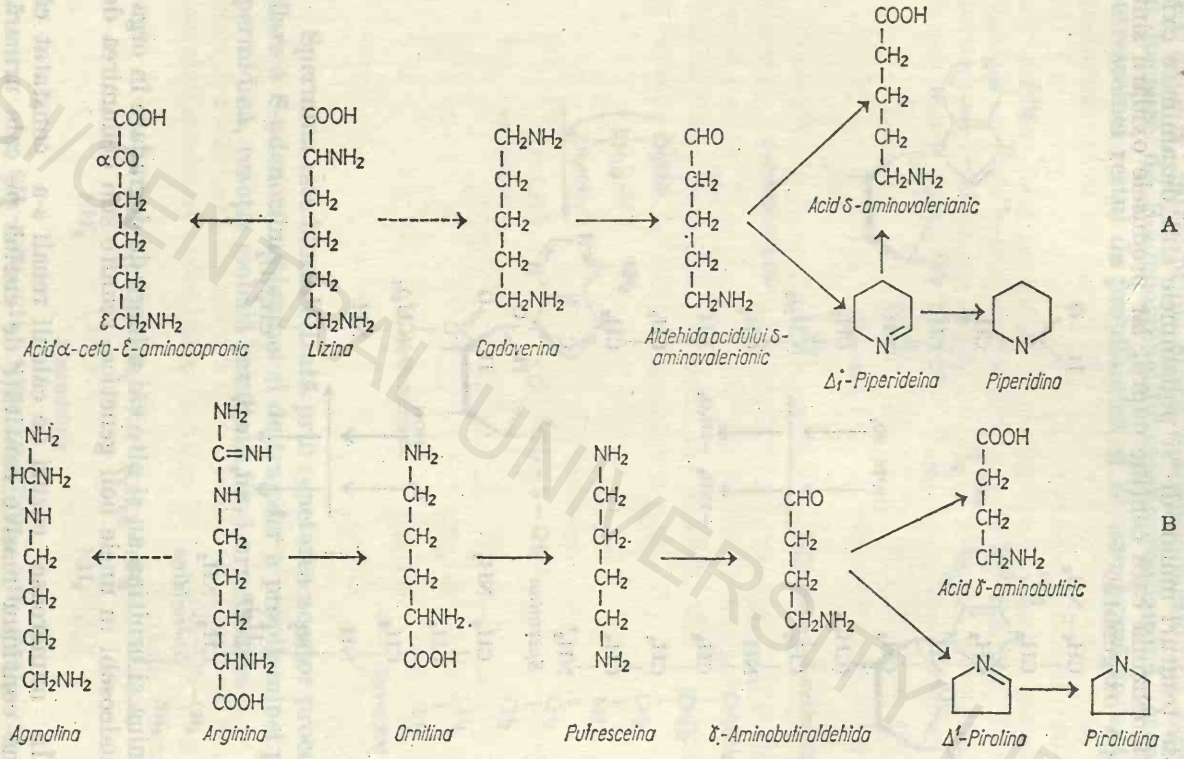


Fig. 19.4. — Cistinuria. Căile minore ale metabolismului lizinei (A) şi argininei (B) în colon. În mod normal, lizina este metabolizată prin transformarea ei în acid α-ceto-ε-aminocapronic, adică printr-o transaminare, dar în colon sub acţiunea bacteriilor cea mai mare parte a lizinei este transformată în cadaverină, care în cistinurii este parţial eliminată în urină şi parţial metabolizată mai departe cu formare de piperidină, identificată în urina normală. Arginina, sub acţiunea bacteriilor din colon, este metabolizată cu formare de ornitină şi putresceină, aceasta fiind eliminată în cistinurie pe cale renală. Dacă putresceina este descompusă mai departe în urină apare pirolidina, care împreună cu piperidina sînt prezente invariabil în urina normală,

este faptul că această anomalie este specifică pentru acești patru aminoacizi, dintre care trei sînt bazici, și se datorește unui defect al sistemului membranar de transport la nivelul tubilor renali.

Formarea calculilor renali bogați în cistină se explică prin aceea că acest aminoacid la *p*H 5—7 este cel mai puțin solubil (0,3—0,4 g/l), iar concentrația lui în urina indivizilor bolnavi — care este acidă, sau puternic acidă — relativ mare (0,5—1 g cistină/zi) ceea ce determină depunerea cisteinei din soluție sub formă de calculi. Aminoacizii bazici — arginina, lizina, ornitina — mult mai solubili nu se întîlnesc în calculii renali. Incidența acestei boli la nou-născuți este de 1/17 000.

Explicarea cistinuriei, după unii autori, constă în incapacitatea tubulilor renali de a reabsorbi cistina, lizina, arginina și ornitina din filtratul glomerular. În sprijinul acestei ipoteze pledează și faptul că metabolismul intermediar al tioaminoacizilor — cistina, cisteina, metionina — la indivizii bolnavi este normal. Pe de altă parte, această ipoteză implică existența unui mecanism comun și specific pentru reabsorbția aminoacizilor implicați în cistinurie, mecanism diferit de cel al reabsorbției celorlalți aminoacizi din filtratul glomerular. Prezența în urina bolnavilor de cistinurie a diaminelor — *cadaverina* și *putresceina* — și a pirolidinei și piperidinei — se explică prin căile minore de degradare ale lizinei și argininei (fig. 19.4).

Cistinuria este o maladie genetică de tip recesiv mendelian, manifestîndu-se numai la indivizii homozigoți. Cistinuria recesivă poate fi *completă și incompletă*, în sensul că bolnavul excretă pe cale urinară mari cantități din cei patru aminoacizi sau excretă numai cistină și lizină, iar eliminarea de arginină și ornitină este normală; în unele cazuri excreția pe cale urinară a acestor aminoacizi este normală, dar se constată formarea calculilor renali (fig. 19.5), ceea ce s-ar explica prin aceea că primele două situații sînt specifice pentru homozigoți iar ultimul — pentru heterozigoți.

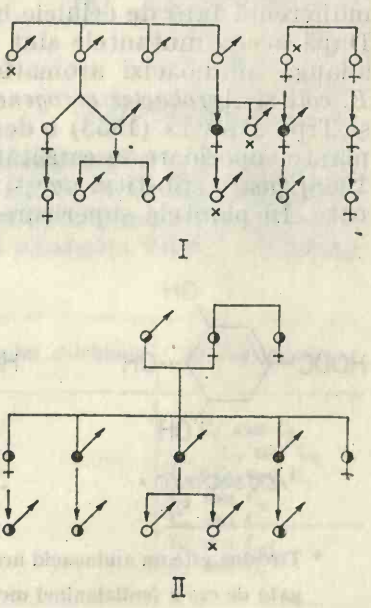


Fig. 19.5. — Arborele genealogic tipic ale unor cazuri de cistinurie. I. Cistinurie recesivă completă, caracterizată prin eliminare urinară masivă de cistină, lizină, arginină și ornitină (○) și II. Cistinurie recesivă incompletă, în care o parte din descendenți elimină masiv cei patru aminoacizi (●), iar altă parte, elimină prin urină mari cantități de cistină și lizină, în timp ce excreția de arginină și ornitină este normală sau crescută nesemnificativ (◑); x — netestat; ○ — indivizi normali (adaptată după M i l n e, M. D., 1970).

Schapira și Dryfus (1975) grupează cistinuriile în patru categorii distincte :

— *tipul I* zise și *complet recesive* în care heterozigoții sînt normali și transportul intestinal al celor patru aminoacizi bibazici este defect ;

— *tipul II* — heterozigoții elimină în exces cistină și lizină ;

— *tipul III* — transportul activ al celor patru aminoacizi este normal la homozigoți și

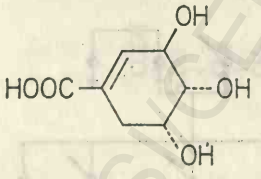
— *tipul IV* caracterizat prin hipercistinurie izolată și printr-o lipsă de aminoacizi bibazici în urină.

Cistinuria este tratată cu *D*-penicilamină care reacționează cu cistina formînd disulfuri ale penicilaminei și cisteinei, dar mai ales compuși relativ solubili ai cisteinei. Izomerul *L*- al penicilaminei este mai puțin eficace și dă efecte secundare concretizate în febră, sindrom nefrotic, semne de intoxicare etc.

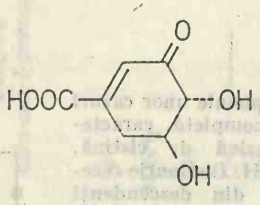
De semnalat că tulburările de reabsorbție tubulară a cisteinei se întîlnesc cu o frecvență de 1/2 500, dar gradul dereglării sau caracterul lor temporar le fac inofensive.

19.4.3 Biosinteza fenilalaninei și triptofanului *

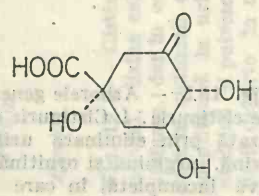
Biosinteza nucleului aromatic al aminoacizilor aromatici — fenilalanina, tirozina și triptofanul — realizată din precursori alifatici a fost studiată și elucidată pe culturi de microorganisme. Celulele bacteriene au fost iradiate cu raze Roentgen sau UV, pentru obținerea unor mutante genetice și apoi cultivate pe un mediu de cultură adecvat în care s-a adăugat penicilină (antibioticul distruge numai bacteriile care se înmulțesc și este indiferentă față de celulele bacteriene care nu se înmulțesc — mutantele). După aceea mutantele sînt cultivate pe un mediu de cultură în care se adaugă aminoacizi aromatici. Folosindu-se de mutantele auxotrofe de *E. coli* și *Aerobacter aerogenes* care necesită pentru creșterea lor Phe, Tyr și Trp Davis (1955) a descoperit că *acidul shichimic*, răspîndit la unele plante superioare în cantități apreciabile (Manskaya și Kodina, 1958) poate substitui acești trei aminoacizi în cazul mutantelor menționate. În plantele superioare au fost identificați acizii :



Acid shichimic



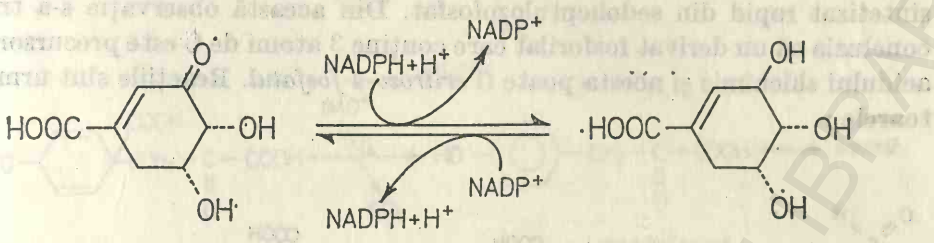
Acid 5-dehidroshichimic



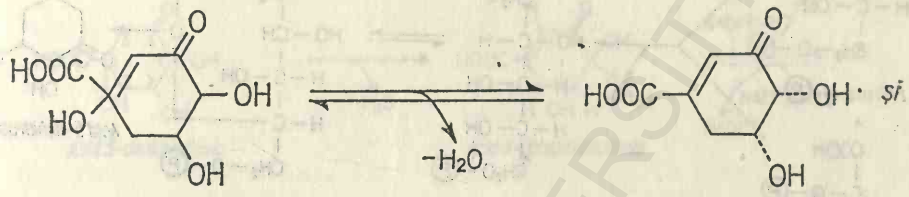
Acid 5-dehidrochinic

* Tirozina este un aminoacid neesențial dar datorită faptului că biogeneza sa este strîns legată de cea a fenilalaninei metabolismul ei va fi analizat împreună cu al acesteia.

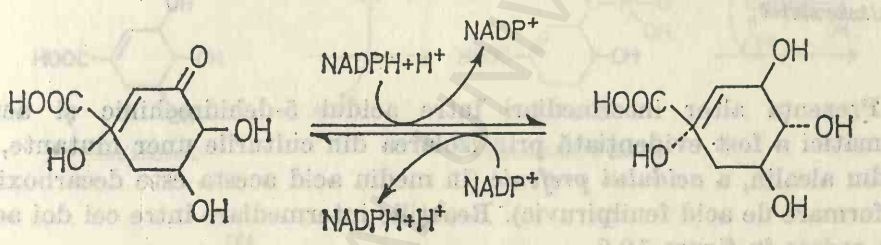
iar din culturile de *E. coli* și din unele plante superioare au fost izolate enzimele care catalizează reacțiile :



Acid shichimic *Acid 5-dehidroshichimic*

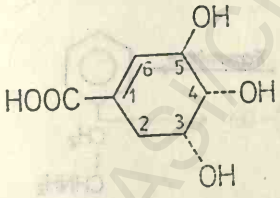


Acid 5-dehidrochinic *Acid 5-dehidroshichimic*



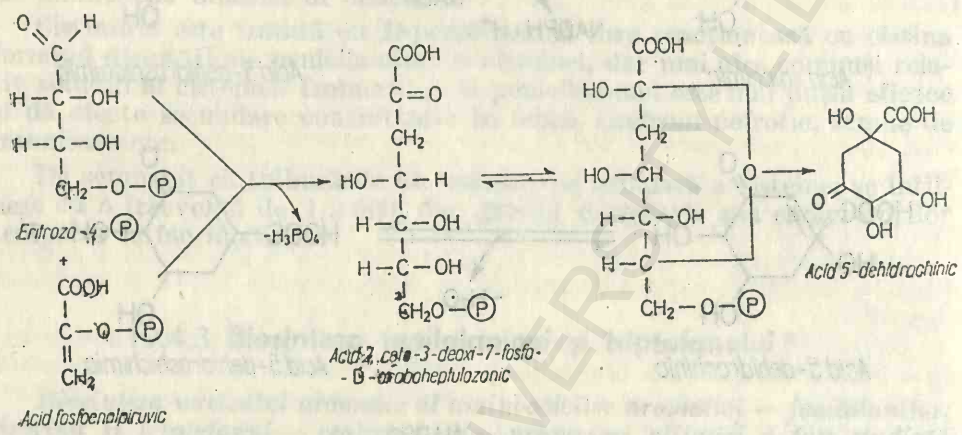
Acid 5-dehidrochinic *Acid 5-hidrochinic*

S p r i s o n și a l ț i i folosind glucoză marcată cu ^{14}C pentru culturile mutante auxotrofe au demonstrat că atomii C_1, C_2 și C_7 ai acidului shichimic se formează din atomii glucozei C_1, C_2 și C_3 și în mod corespunzător din C_5, C_6 și C_4, ceea ce lasă să se presupună existența unui intermediar cu trei atomi de carbon :



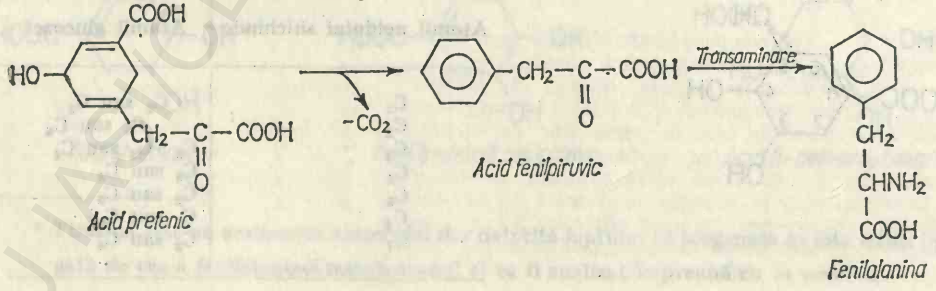
Atomii acidului shichimic	Atomii glucozei
C_1	C_2 sau C_5
C_2	C_1 sau C_6
C_3	C_2+C_3 sau C_4
C_4	C_3 sau C_4
C_5	C_2 sau C_5
C_6	C_1 sau C_6
C_7	C_3 sau C_4

Acidul piruvic s-a dovedit un precursor necorespunzător pentru sinteza acidului shichimic la plantele superioare, dar *acidul 5-dehidrochinic* este sintetizat rapid din sedoheptulozofosfat. Din această observaţie s-a tras concluzia că un derivat fosforilat care conţine 3 atomi de C este precursorul acidului shichimic şi acesta poate fi *eritrozo-4-fosfatul*. Reacţiile sînt următoarele :



Prezenţa altor intermediari între acidul 5-dehidrochinic şi acizii aromatici a fost evidenţiată prin izolarea din culturile unor mutante, în mediu alcalin, a *acidului prefenic* (în mediu acid acesta este decarboxilat cu formare de acid fenilpiruvic). Reacţiile intermediare între cei doi acizi sînt redate în figura 19.6.

Acidul prefenic este precursorul biosintezei *Phe* şi *Tyr*, căile fiind diferite la plante şi la animale. La plante acidul prefenic este transformat în *acid fenilpiruvic* sau în acid *p-hidroxifenilpiruvic*, care prin transaminare formează aminoacizii corespunzători :



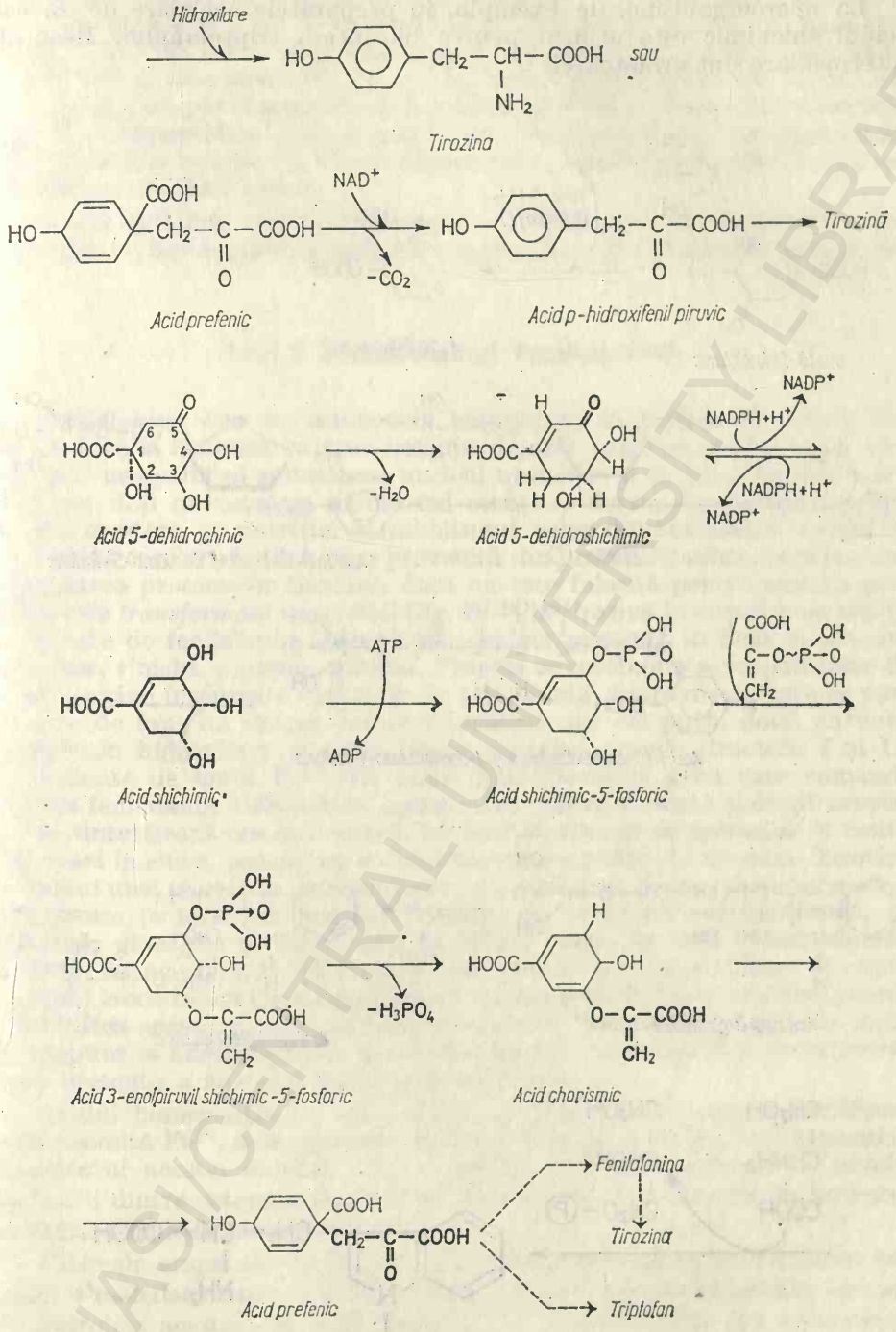
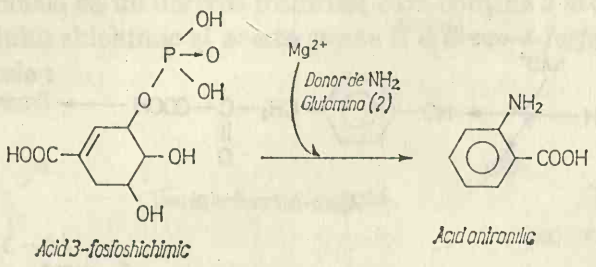


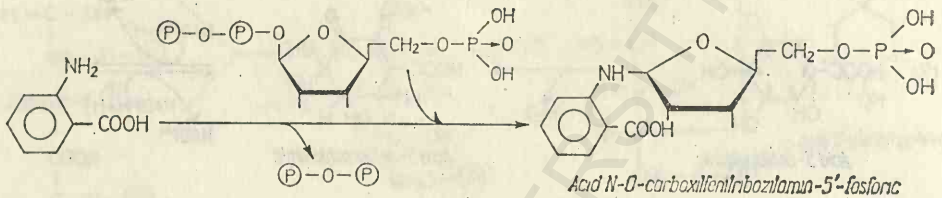
Fig. 19.6. — Căile comune ale biosintezei aminoacizilor aromatici dintr-un precursor comun — acidul shichimic.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

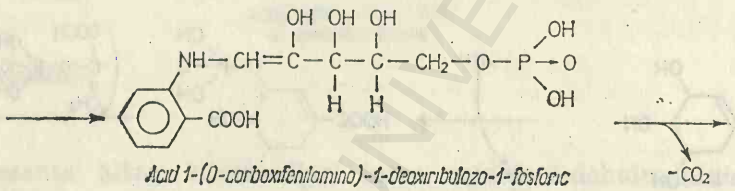
La microorganisme, de exemplu, în preparatele acelulare de *E. coli* acidul shichimic este utilizat pentru biosinteza triptofanului. Reacțiile intermediare sînt următoarele :



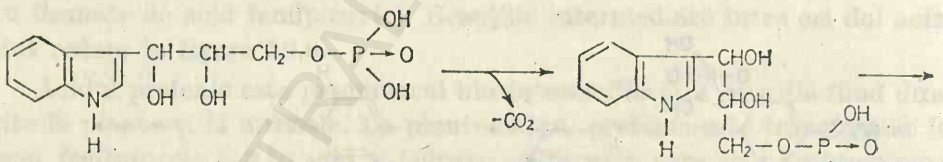
Acid 3-fosfoshichimic *Acid antranilic*



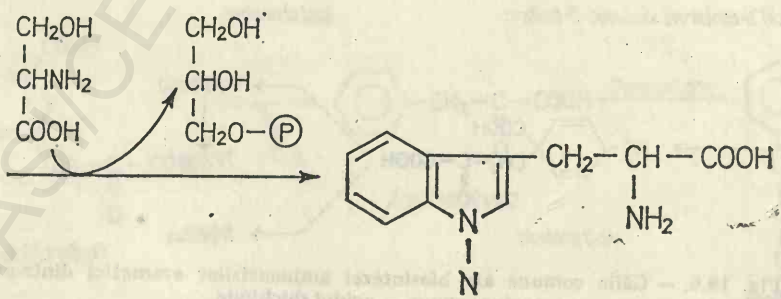
Acid N-O-carboxifenilriboziamin-5'-fosforic



Acid 1-(O-carboxifenilamino)-1-deoxiribulozo-1-fosforic



Acid indol-3-glicerolfosforic *Acid indolilglicerolfosforic*



Ultima reacție în biosinteza triptofanului este catalizată de enzima *triptofan sintetaza*, care are în calitate de cofactor enzimatic fosfopiridoxalul. Enzima a fost obținută în stare cristalină, are o masă moleculară de 135 000 și este alcătuită din patru catene polipeptidice : 2 catene α și 2 catene β, care pot fi separate și ale căror structuri primare sînt cunoscute. Catenele polipeptidice α sau β (sub formă de dimeri β_2) pot cataliza penultima și ultima reacție cu viteze relativ mici ; numai ansamblul lor dă un randament catalitic sporit.

Acidul shikimic este un important intermediar și în biosinteza altor biomolecule, de exemplu, a ligninei, coenzimelor Q și plastochinonelor etc.

19.4.4 Metabolismul fenilalaninei

Fenilalanina este un aminoacid esențial și eliminarea lui totală din hrană duce la instaurarea unei balanțe de azot negative. Organismul animal este incapabil să sintetizeze nucleul aromatic și în lipsa fenilalaninei, tirozina, deși nu este un aminoacid esențial, devine un factor limitant pentru creștere și nutriție. Metabolismul celor doi aminoacizi aromatici este strîns corelat : fenilalanina provenită din proteinele alimentare sau din degradarea proteinelor tisulare, dacă nu este folosită pentru sinteza proteică este *transformată ireversibil* (fig. 19.7) în tirozină în cursul unei reacții catalizate de fenilalanin hidroxilază, enzimă prezentă în ficat și absentă în creier, rinichi, pulmon, mușchi. Fracția acvosolubilă a preparatelor de ficat conține însemnate cantități de fenilalanin hidroxilază, care se pare că este de fapt un sistem complex alcătuit din cel puțin două enzime : fenilalanin hidroxilaza și două fracții proteice stabile (fracțiile I și II) dependente de ionul Fe^{2+}. În cazul fenilcetonuriei gena care comandă sinteza fenilalanin hidroxilazei lipsește sau este modificată și drept urmare nu se sintetizează enzimă activă, iar fenilalanina se acumulează în cantități mari în sînge, paralel cu o diminuare a cantității de tirozină. Tirozina în cursul unei reacții de transaminare, catalizată de *tirozin-glutamat aminotransferaza* (activată la nivelul ficatului de hormonii corticosteroizi, de insulină, glucagon și inactivată de STH), trece în acid *p*-hidroxifenilpiruvic, iar acesta sub influența *p*-hidroxifenil piruvat oxidazei (o cupru enzimă) trece în acid homogentizinic. Acidul ascorbic este esențial pentru activitatea acestei ultime enzime, deoarece în lipsa lui la cobai și la copii, ca răspuns la administrarea per os de tirozină, se constată o excreție urinară crescută a acidului *p*-hidroxifenilpiruvic.

Acidul homogentizinic este oxidat în prezența *homogentizat oxidazei*, care necesită Fe^{2+}, a compușilor sulfhidril liberi și a oxigenului molecular. Rezultatul acestei oxidări este scindarea nucleului benzenic la nivelul legăturii dintre catena laterală și gruparea hidroxil adiacentă cu formarea acidului 4-maleilacetoacetic.

Ultimele etape ale acestei căi metabolice constau în izomerizarea acidului 4-maleilacetoacetic cu formare de acid 4-fumarilacetoacetic, urmată de hidroliza acestuia în acid fumaric și acid acetoacetic. În consecință, metabolismul fenilalaninei pe această cale este de fapt un complex de reacții

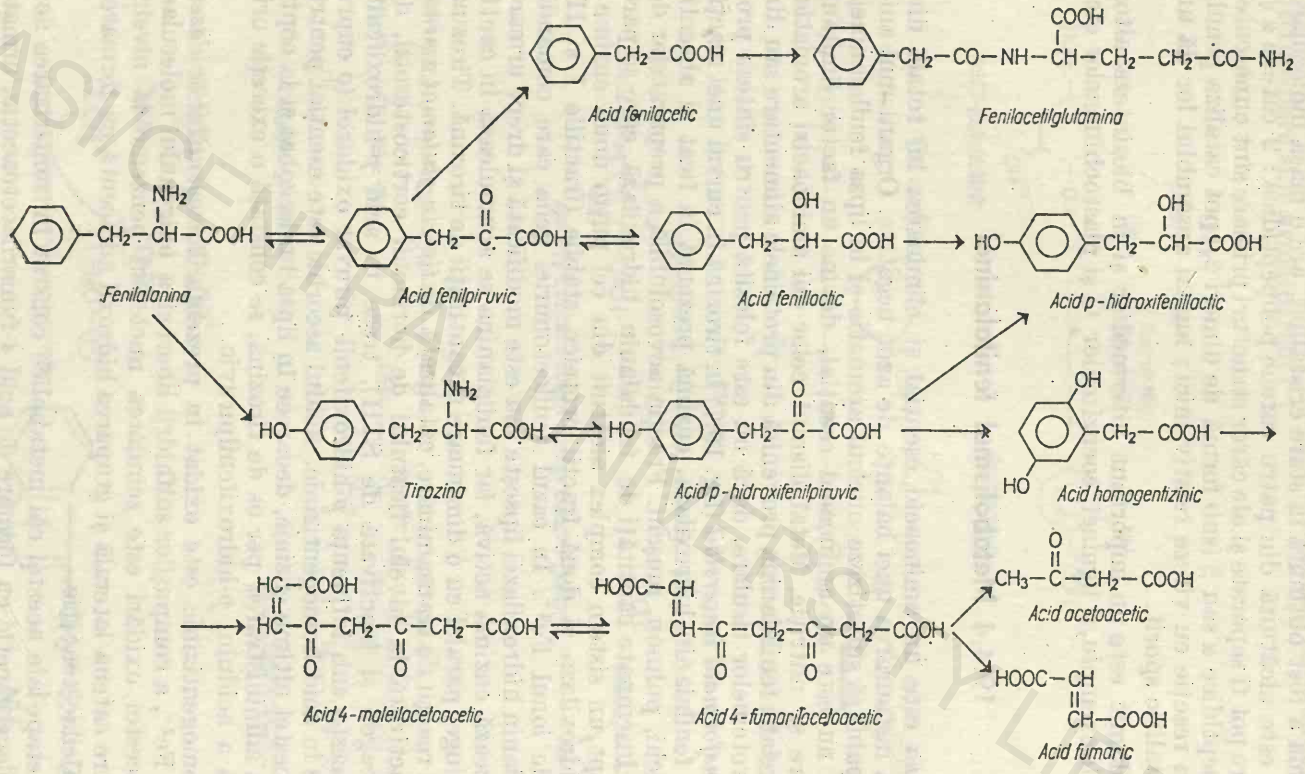


Fig. 19.7. — Căile principale ale metabolismului fenilalaninei și tirozinei și formarea acidului fumaric și a acidului acetoacetic din acești aminoacizi.

BCU IAȘI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

succesive de hidroxilare a nucleului aromatic, transaminare, oxidare, decarboxilare, izomerizare și hidroliză.

Experimental s-a demonstrat că acizii fenilpiruvic și fenillactic pot înlocui în dietă fenilalanina, ceea ce înseamnă că reacțiile în cursul cărora acești acizi se formează sînt reversibile (fig. 19.7). Omul adult în condiții normale excretă 250—500 mg/zi de fenilacetilglutamină provenită în principal din fenilalanină *via* acidului fenilpiruvic.

O cale metabolică mai deosebită a fenilalaninei și tirozinei a fost descrisă pentru ficatul de șobolan, în care acidul *p*-hidroxifenillactic este deshidratat și β-oxidat în cursul mai multor reacții, formînd *acid p-hidroxibenzonic*. Acest acid este un precursor al 5-demetoxiubichonona-9 din care se formează *ubichinonele* participante la transferul de electroni la animale și microorganisme (fig. 19.8).

Fenilcetonuria, *imbecilitatea fenilpiruvică, boala lui* Folling *sau oligofrenia fenilpiruvică* apare ca un defect al metabolismului aminoacizilor și se caracterizează prin prezența unor mari cantități de *acid fenilpiruvic* (0,5—2 g/zi) în urină. Bolnavii — de obicei blonzi cu ochi albaștri — manifestă semne evidente de înapoiere mintală, și urina lor conține și cantități excesive de *acid fenilacetic, fenilacetilglutamină* și *fenilalanină* (fig 19.8). În urina bolnavilor de fenilcetonurie se întîlnesc și cantități apreciabile ale unor derivați hidroxilați ai acidului fenilacetic : acidul *p*-hidroxifenilacetic, acid *p*-hidroxifenillactic, acid *o*-hidroxifenilacetic. Frecvența cazurilor de fenilcetonurie variază între 1/25 000 la 1/50 000 indivizi și este o *boală ereditară* cu un *caracter recesiv tipic mendelian*. În sînul unei populații o persoană din 90 este purtătoarea unei gene a fenilcetonuriei (Schapira și Dreyfus, 1975) și pentru exprimarea ei completă este necesară căsătoria între doi heterozigoți purtători ai acestei gene. Concentrația fenilalaninei în stările de fenilcetonurie este mult crescută nu numai în urină dar și în plasma sanguină (de la 1mg% poate ajunge la 15 mg% și chiar la 60 mg%) și în lichidul cerebrospinal. Drept cauză primară a fenilcetonuriei se presupune a fi absența fracției proteice labile I din complexul enzimatic al fenilalanilhidroxilazei hepatice ; fracția proteică II, mult mai stabilă din acest complex este normală.

Cauzele înapoierii mintale în fenilcetonurii nu sînt bine stabilite. Se presupune că unul dintre produșii metabolismului fenilalaninei, prezent în cantități excesiv de mari, blochează oxidarea fenilalaninei. Tratamentul acestei boli se face prin excluderea și controlul sever al consumului de fenilalanină sau de alimente bogate în acest aminoacid, însă limitarea severă conduce la apariția unor dereglări în sinteza proteinelor, încetinirea creșterii și dezvoltării organismelor, leziuni iritante, dermatite exfoliante etc.

19.4.5 Metabolismul tirozinei în cadrul căilor catabolice

Catabolismul tirozinei poate decurge cu degradarea totală sau parțială a moleculei, în ambele cazuri metaboliții rezultați fiind eliminați. Degradarea parțială a moleculei poate fi urmată și de reutilizarea pentru diferite reacții anabolice a derivaților rezultați.

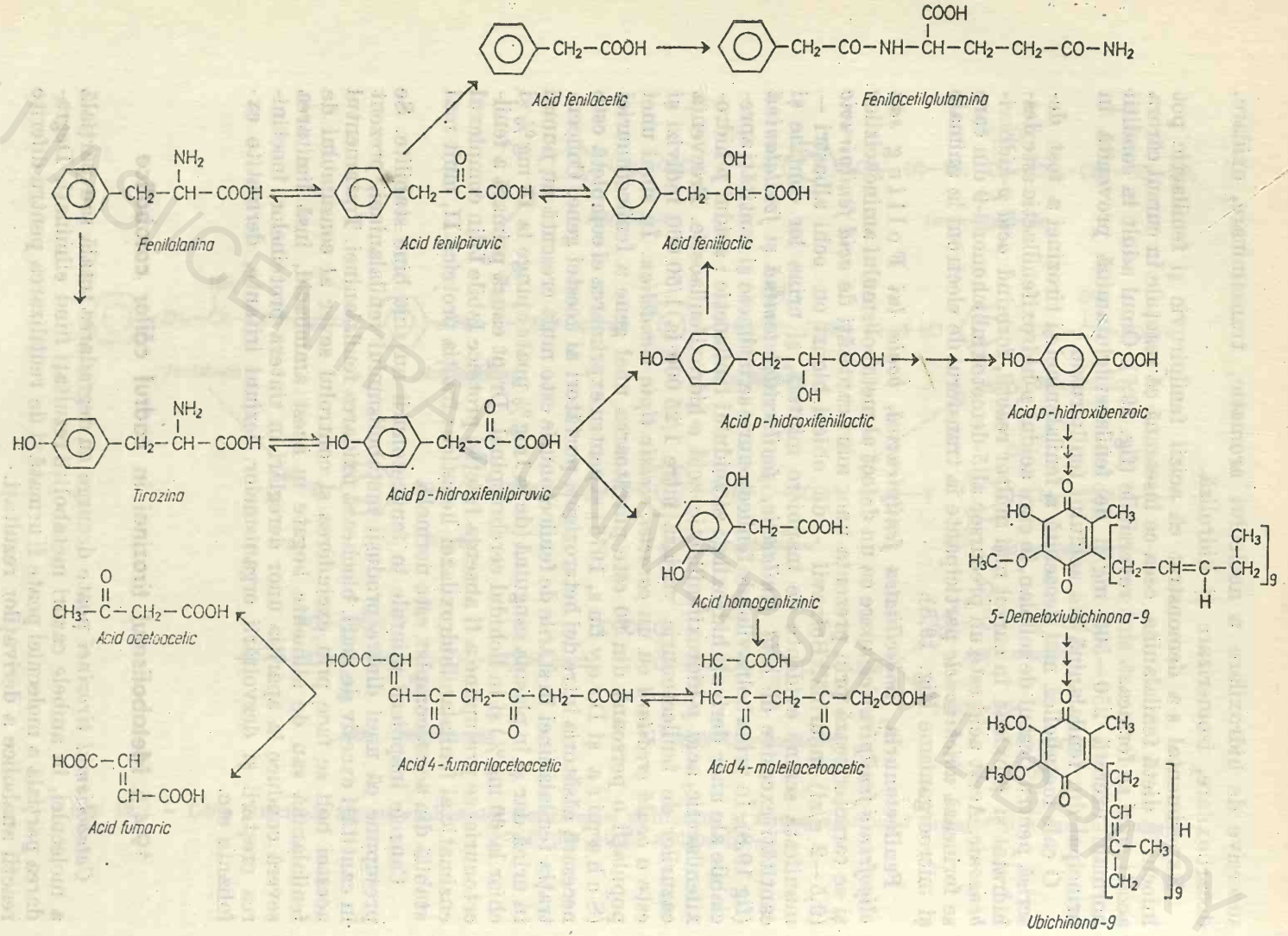


Fig. 19.8. — Alte căi metabolice ale fenilalaninei și tirozinei. Biosinteza ubichinonelor.

Catabolizarea integrală a tirozinei constituie *principala cale a metabolismului acestui aminoacid* şi are loc în principal în ficat şi parţial în rinichi; este un proces oxidativ în care intervin sisteme enzimatice mai mult sau mai puţin complicate. Prima etapă a degradării complete a tirozinei o constituie reacţia de *transaminare*, realizată de tirozin aminotransferază; este o etapă obligatorie şi limitativă, în care în calitate de coenzimă este necesar piridoxalfosfatul, iar ca acceptor al grupărilor amino (numai) exclusiv acidul 2-oxoglutaric (reacţia 1, fig. 19.9). Acidul *p*-hidroxi-

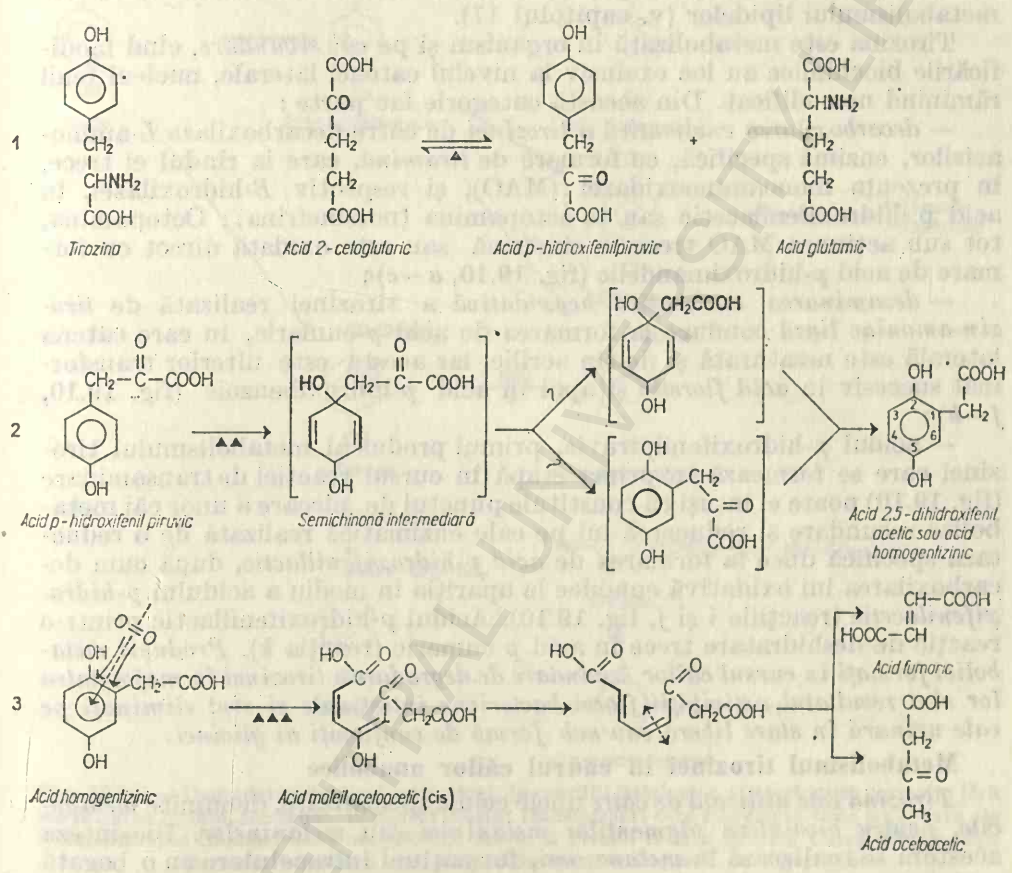


Fig. 19.9. — Degradarea integrală a tirozinei cu formare de acid fumaric şi acid acetoacetic. Denumirea enzimelor şi a cofactorilor necesari este prezentată în text. ▲ — Dereglări ale metabolismului tirozinei (v. textul).

fenilpiruvic format este transformat sub acţiunea p-hidroxifenilpiruvat hidroxilazei în acid homogentizinic printr-un mecanism de reacţie neelucidat. În figura 19.9 sînt schiţate şi fazele intermediare probabile ale acestei reacţii enzimatice. De semnalat că enzima este inhibată prin substratul ei, însă ionii feroşi, acidul ascorbic şi derivaţii acidului folic, deci substanţe cu caracter reducător, protejează enzimă în cazul unui exces de substrat.

Acidul homogentizinic este în continuare oxidat, cu deschiderea nucleului benzenic, în prezența oxigenului molecular și a homogentizat oxigenazei, care este o oxigen transferază (reacția *3* fig. 19.9). Pentru mersul reacției sînt necesari drept cofactori Fe^{2+}, glutationul și acidul ascorbic. Produsul acestei reacții, acidul maleilacetoacetic este transformat în prezența unei izomeraze în acid fumarilacetoacetic, iar acesta este hidrolizat de fumarilacetoacetază dînd, în final, acid acetoacetic și acid fumaric. Acești doi acizi finali sînt metabolizați în continuare — acidul fumaric în ciclul lui K r e b s (v. capitolul 15), iar acidul acetoacetic în cadrul metabolismului lipidelor (v. capitolul 17).

Tirozina este metabolizată în organism și pe *căi secundare*, cînd modificările biochimice au loc exclusiv la nivelul catenei laterale, nucleul fenil rămînînd nemodificat. Din această categorie fac parte :

— *decarboxilarea enzimatică a tirozinei* de către decarboxilaza *L*-aminoacizilor, enzimă specifică, cu formare de *tiramină*, care la rîndul ei trece, în prezența monoaminooxidazei (MAO), și respectiv *B*-hidroxilazei, în acid p -hidroxifenilacetic sau în octopamina (norsinefrina) ; Octopamina, tot sub acțiunea MAO trece în sinefrină sau este oxidată direct cu formare de acid *p*-hidroximandelic (fig. 19.10, *a—e*) ;

— *dezaminarea enzimatică neoxidativă* a tirozinei realizată de *tirozin-amoniac liază* conduce la formarea de acid *p*-cumaric, în care catena laterală este nesaturată și de tip acrilic, iar acesta este ulterior transformat succesiv în *acid floretic* și apoi în acid *p*-hidroxibenzoic (fig. 19.10, *f—h*) ;

— acidul *p*-hidroxifenilpiruvic, primul produs al metabolismului tirozinei care se formează în prima etapă în cursul reacției de transaminare (fig. 19.10) poate el însuși că constituie punctul de plecare a unor căi metabolice secundare și reducerea lui pe cale enzimatică realizată de o reductază specifică duce la formarea de *acid p-hidroxifenillactic*, după cum decarboxilarea lui oxidativă conduce la apariția în mediu a acidului *p-hidroxifenilacetic* (reacțiile *i* și *j*, fig. 19.10). Acidul *p*-hidroxifenillactic printr-o reacție de deshidratare trece în acid *p*-cumaric (reacția *k*). *Produșii metabolici formați în cursul căilor secundare de degradare a tirozinei în majoritatea lor sînt rezultatul activității florei bacteriene intestinale și sînt eliminați pe cale urinară în stare liberă sau sub formă de conjugați ai glicinei.*

Metabolismul tirozinei în cadrul căilor anabolice

Tirozina este utilizată de către unele celule specializate, denumite *melanocite, pentru biosinteza pigmenților melaninici* sau *melaninelor*. Biosinteza acestora se realizează în *melanozomi*, formațiuni infracelulare cu o bogată activitate tirozinazică. *Premelanozomii* sînt melanozomi fără melanine ; după încheierea procesului de biosinteză a melaninelor melanozomii devin *granule melaninice*.

Procesul de biosinteză a melaninelor se desfășoară în două etape distincte — *prima etapă* constă în oxidarea tirozinei cu formare de dihidroxifenilalanină sau DOPA (reacția *a*, fig. 19,11) care este la rîndul ei oxidată la dopachinonă (reacția *b*, fig. 19.11) ; aceste două reacții de oxidare sînt catalizate de tirozinază sau *o*-difeniloxidază, o cupru-enzimă a cărei activitate este stimulată de cantitatea de dihidroxifenilalanină formată în reacția *a*, care, de altfel, este și reacția limitativă a procesului de melanogeneză, avînd viteza cea mai mică.

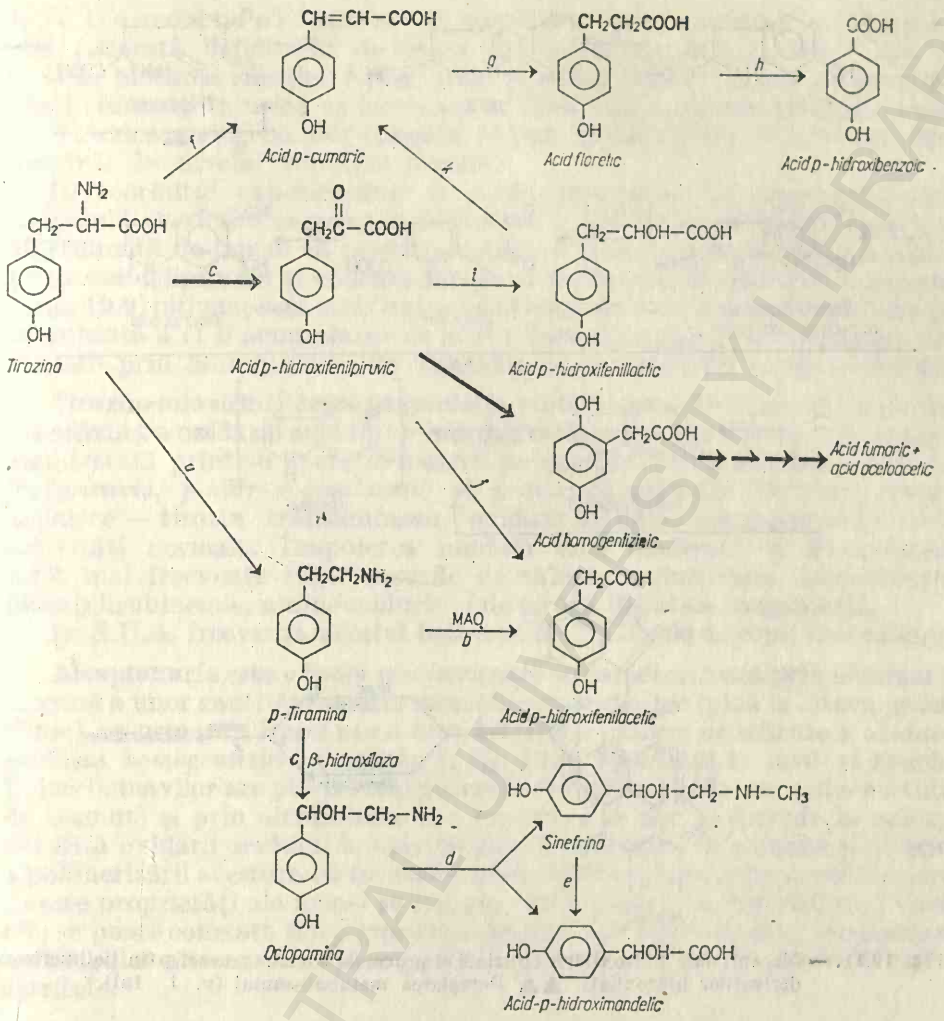


Fig. 19.10. — Degradarea parțială a tirozinei, în condiții fiziologice și biochimice normale, fără modificarea ciclului benzenic. În cadrul acestor transformări care reprezintă căile secundare ale metabolismului tirozinei toate modificările survin la nivelul catenei laterale. Calea principală a degradării tirozinei este schițată în reacțiile indicate cu săgeți groase.

Etapa secundă, care cuprinde reacțiile *c—h* din figura 19.11 se caracterizează prin faptul că toate reacțiile sînt spontane și decurg în absența enzimelor ; ciclizarea indol-5, 6-chinonei conduce la formarea unui compus insolubil, cu o masă moleculară apreciabilă și capabil să reacționeze cu proteinele, probabil, cu grupările SH ale acestora și să formeze melanoproteine. În cursul procesului de ciclizare se pot forma compuși insolubili de culoare brună denumiți *eumelanine*, sau de culoare galbenă — denumiți *feomelanine*.

Alte căi anabolice în metabolismul tirozinei. Dehidroxifenilalanina rezultată prin oxidarea tirozinei este utilizată de organismul animal pentru

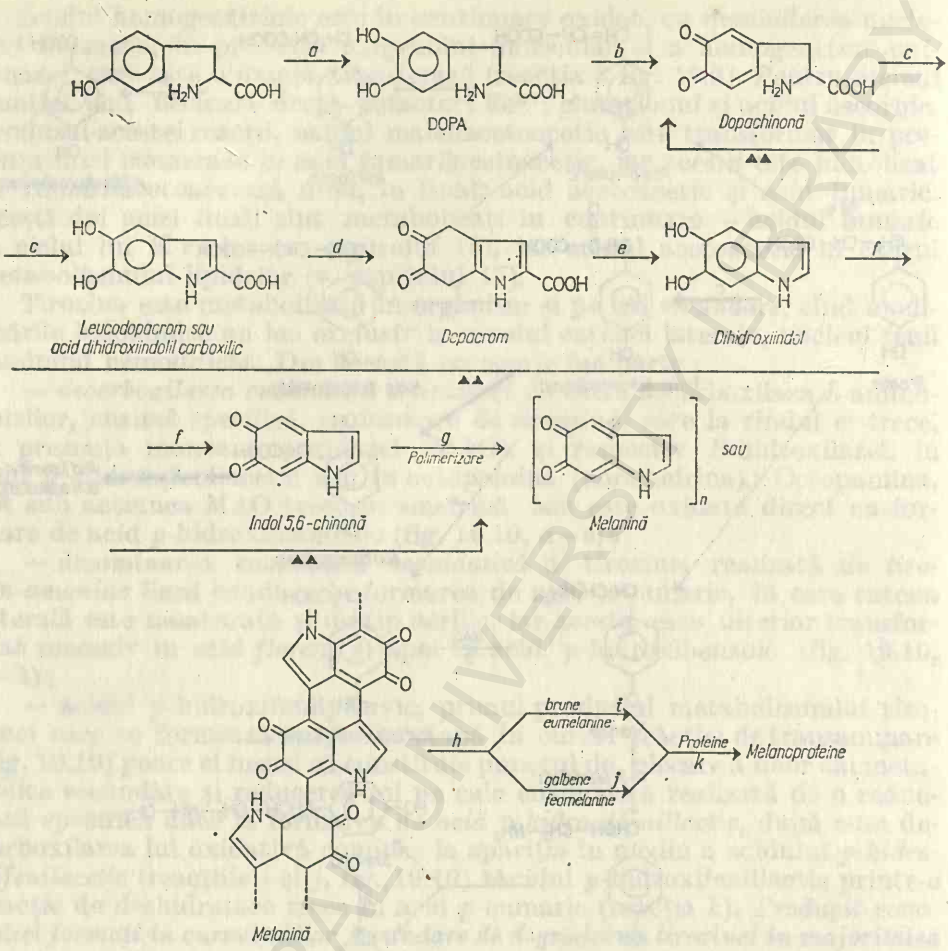


Fig. 19.11. — Mecanismele hidroxilării tirozinei și procesele melanogenezei prin polimerizarea derivaților hidroxilați. ▲▲ Dereglarea metabolismului (v. t tul).

biosinteza noradrenalinei și adrenalinei, în timp ce tirozina este utilizată la nivelul glandei tiroide pentru biosinteza hormonilor tiroidieni (v. capitolul 13).

Dereglarea biochimică a metabolismului tirozinei *se datorește de cele mai multe ori unor enzimopatii totale sau parțiale, care de regulă sînt ereditare.* Majoritatea enzimopatiilor sînt însoțite de tirozilurii — eliminarea exagerată de produși metabolici intermediari în procesul de degradare a tirozinei monohidroxilați în pozițiile *orto-* sau *para-* și posedînd nucleul fenil nemodificat.

Tiroziluria, descoperită de Medes în 1927 a suscitat vii discuții contradictorii deoarece eliminarea pe cale urinară a acizilor *p*-hidroxifenilpiruvic și *p*-hidroxifenillactic sînt în funcție de prezența în dietă a tirozinei sau a proteinelor bogate în acest aminoacid. În 1966 La Du (citat

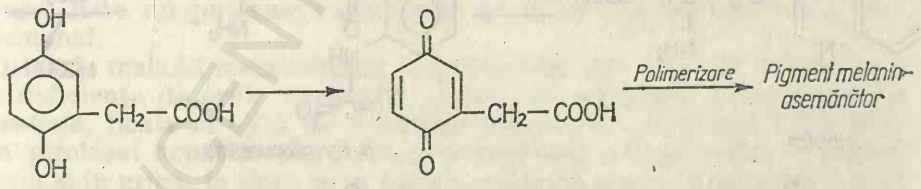
după L e m o n n i e r) admite că tiroziluria sau tirozinoza lui M e d e s este datorată deficitului de tirozin aminotransferază hepatică, ceea ce duce la blocarea reacției *1* (fig. 19.9) și *a* (fig. 19.11). Acizii *p*-hidroxifenilați eliminați în urină se formează în acest caz la nivelul țesutului renal din tirozina endogenă sau exogenă și sînt eliminați direct în urină, fără resorbție la nivelul tubulilor renali.

În scorbutul experimental și clinic, precum și în hipertirozinemia neonatală (vezi *tirozinemia*) se întîlnește o *tiroziluric secundară* care este determinată de faptul că acidul ascorbic care proteja hidroxilaza acidului *p*-hidroxifenilpiruvic și cataliza formarea acidului homogentizinic (reacția *2*, fig. 19.9) influențează activitatea acestei enzime, determinînd o diminuare accentuată a ei și acumularea de acid *p*-hidroxifenilpiruvic. Efectele sînt anulate prin administrare de vitamina *C* în cantități corespunzătoare.

Tirozinemia se întîlnește *în special la copii* și constă în lipsa sau activitatea scăzută a oxidazei acidului *p*-hidroxifenilpiruvic din ficat și din rinichi, manifestată printr-o excreție masivă pe cale urinară a acizilor *p-hidroxifenilpiruvic*, *p-hidroxi-fenilacetic* și *p-hidroxifenillactic*. Celelalte enzime hepatice — tirozin transaminaza, oxidaza acidului homogentizinic — au activități normale. Înapoierea mintală este moderată și inconstantă, mult mai frecvente fiind cazurile de rahitism, glucozurie, albuminurie, hiperbilirubinemie, aminoacidurie și de ciroză hepatică congenitală.

În S.U.A. frecvența acestei boli este de 1/275 000 de copii nou-născuți.

Alcaptonuria este *o boală ereditară* care se caracterizează prin eliminarea în urină a unor cantități masive de *acid homogentizinic* (pînă la cîteva grame zilnic), ca urmare a lipsei sau a unei activități extrem de scăzute a *oxidazei acidului homogentizinic*, (reacția *3*, fig. 19.9) localizată în ficat și rinichi. Urina bolnavilor are proprietăți puternic reducătoare (dar nu reduce oxidul de bismut) și prin alcalinizare sau expunere la aer se închide la culoare datorită oxidării acidului homogentizinic cu formare de chinone și ulterior a polimerizării acestora cu formarea unor substanțe melanin-asemănătoare. Aceste proprietăți ale urinei se mențin toată viața și la indivizii mai vîrstnici se poate constata și o pigmentare anormală a ligamentelor, tendoanelor cartilagiilor articulare și altor țesuturi *(ochronosis)* sau se dezvoltă osteoartritele.



Acid homogentizinic *Acid benzochinonacetic*

Lipsa acidului ascorbic, ca dealtfel și o dietă săracă în proteine, duce la o diminuare a alcaptonuriei. În mod normal acidul homogentizinic este absent în sîngele circulant, deoarece este rapid metabolizat la nivelul ficatului.

Tirozinoza sau hipertirozinemia ereditară caracterizată prin *tirozinemie* accentuată (30—120 mg/l față de 10—20 mg/l *în normal*), *tiroziluric* abun-

dentă cu eliminare masivă de acizi *p*-hidroxifenilpiruvic, *p*-hidroxifenillactic şi *p*-hidroxifenilacetic, însoţită de *meliturie*, *hiperaminoacidurie*, *hiperfosfaturie* şi de *hipermetioninemie* se datoreşte lipsei în hepatocit a hidroxilazei acidului *p*-hidroxifenilpiruvic (fig. 19.9). Lemonnier (1970) este de părere că mecanismul acestei decompensări tisulare este încă puţin cunoscut, mai ales dacă se ţine seama de faptul că hipermetioninemia observată, precum şi de excreţia de acid δ-aminolevulinic şi alte manifestări biochimice ale bolii nu pot fi explicate din punct de vedere biochimic.

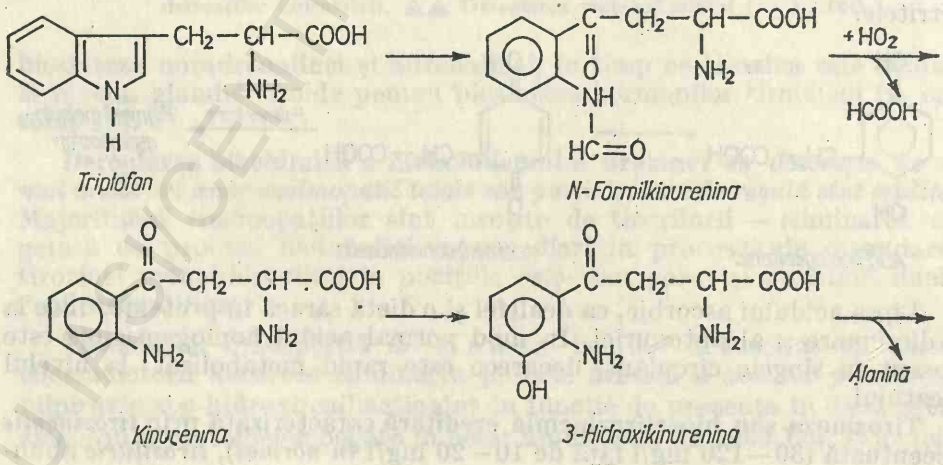
Albinismul este o boală *congenitală ereditară* care constă în *dereglarea biosintezei pigmenţilor melaninici în melanocite* şi printr-un defect de *depozitare a pigmenţilor în melanocitele pielii*, fanerelor, irisului şi retinei. Acest defect poate fi local sau general. Boala este transmisă genetic în mod diferit, în funcţie de forma de albinism *(universal complet, universal incomplet, parţial localizat, ocular)*. Albinismul caracterizat prin decolorarea pielii, părului şi ochilor poate fi determinat de incapacitatea melanocitelor de a utiliza tirozina (fig. 19.11, reacţia *a*,) sau de a biosintetiza tirozinaza. Semnele clinice evidente ale albinismului sînt acumulările de fenilalanină şi tirozină în urină, ca urmare a imposibilităţii de a transforma tirozina în dihidroxifenilalanină şi ulterior în DOPA-chinonă.

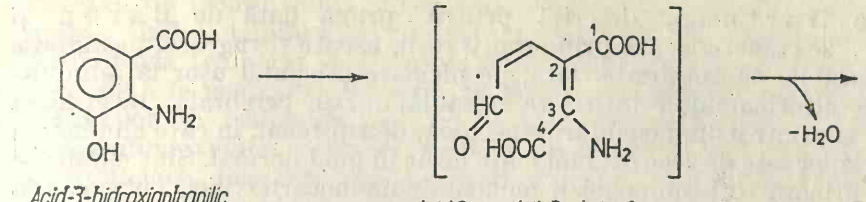
Melanuria. Produşii intermediari ai biosintezei melaninelor sînt eliminaţi pe cale urinară (reacţiile *c—h*, fig. 19.11) şi urina nu se închide la culoare decît după expunerea ei îndelungată la aer. Cauzele melanouriilor rămîn obscure.

19.4.6 Metabolismul triptofanului

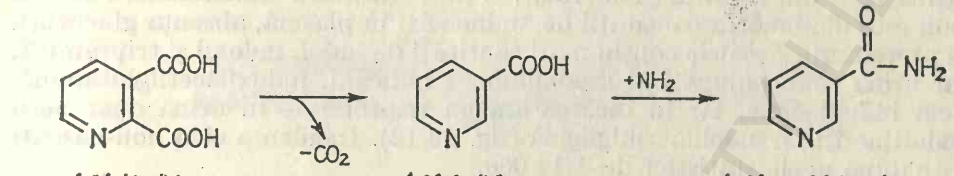
Metabolismul triptofanului se realizează pe mai multe căi conducînd la diverse substanţe, dintre care unele cu rol deosebit de important în activitatea organismului.

Astfel din triptofan printr-o serie de transformări se poate ajunge la acid nicotinic şi la amida sa, vitamina *PP*:





Acid-3-hidroxiantranilic *Acid 2-acroleil-3-aminofumaric*



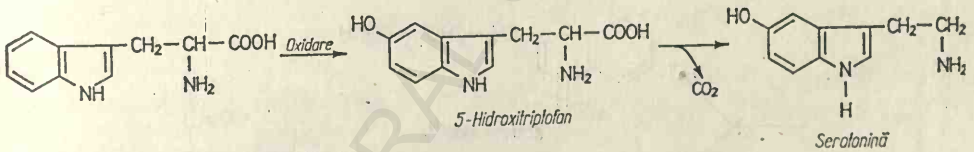
Acid chinolinic *Acid nicotinic* *Amida acidului nicotinic*

După cum se vede, în prima reacție, prin oxidarea dublei legături a nucleului pirolic se obține N-formilkinurenina. Reacția este catalizată de o enzimă porfirinică ce conține fier, denumită triptofan pirolază.

Legătura de tip amidic din N-formilkinurenină este apoi hidrolizată formîndu-se kinurenină și acid formic. Kinurenina este oxidată cu oxigenul din aer la hidroxikinurenină, care se scindează apoi în alanină și acid 3-hidroxiantranilic.

Din această substanță, printr-o oxidare cu deschidere de ciclu, se formează un compus intermediar prin ciclizarea căruia rezultă acidul chinolinic și de la acesta prin decarboxilare se obține acidul nicotinic.

O altă posibilitate de catabolizare a triptofanului este transformarea lui în serotonină:



5-Hidroxitriptofan *Serotonină*

Serotonina este o substanță cu acțiune inhibitoare asupra oxidărilor celulare. Este un puternic vasoconstrictor și are un important rol neurohormonal.

În unele maladii metabolismul triptofanului este dereglat ca urmare a unor deficiențe de ordin enzimatic. Astfel, de exemplu, în *triptofanuria congenitală*, boala însoțită de debilitate mintală s-a constatat lipsa triptofan pirolazei hepatice și o creștere accentuată a triptofanului în serul sanguin și în urină, în timp ce în *hidroxichinureninemie*, caracterizată prin lipsa de acid nicotinic și excreția crescută de hidroxichinurenină, chinurenină și acizi xanturenic și chinurenic — cauza principală constă, probabil, într-o anomalie a apoenzimei din structura chinureninazei.

În cazul metabolismului triptofanului s-a putut descrie și anomalia relațiilor dintre apoenzimă și coenzimă, în speță pentru chinureninază. Simptomele maladiei sînt similare cu cele ale hidroxichinureninemiei, plus înapoiere mintală, dar în aceste cazuri *aciduria xanturenică* ce se instalează este *dependentă de piridoxină*.

Boala Hartnup, descrisă pentru prima dată de Baron și colab. se caracterizează prin erupții roșii, uscate și rugoase, pelagroase și fotosensibile pe antebrațe, față, pe picioare (răspund ușor la administrare de nicotinamidă), întîrziere mintală, ataxie cerebrală, încetinirea creșterii și printr-o aminoacidurie specifică, de tip renal, în care eliminarea aminoacizilor este de zece ori mai mare decît în mod normal. Sînt eliminate pe cale urinară toți aminoacizii monoaminomonocarboxilici, cu excepția glicinei, prolinei și hidroxiprolinei care, printr-un mecanism separat, sînt reabsorbiți din filtratul glomerular. O altă trăsătură caracteristică acestei boli este diminuarea cantității de aminoacizi în plasmă, absența glucozurii și proteinurii. Fecalele conțin mari cantități de indol, indoxil și triptamină, iar urina sulfoconjugați ai indoxilului — indicani, indoxilacetilglutamină, acid indolilacetic, iar în încărcătura cu triptofan — în urină apar acizi indolilacrilic și indolilacrililglicină (fig. 19.12). Incidența ei la nou-născuți este după unele statistici de 1/14 000.

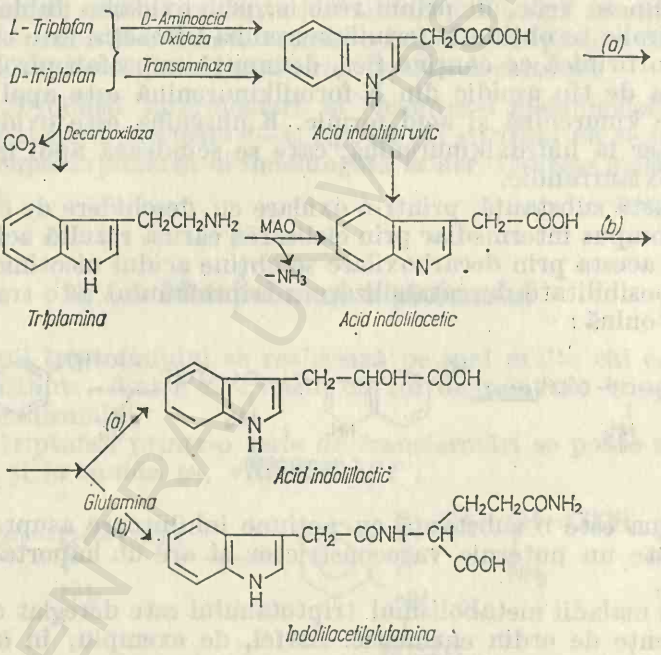


Fig. 19.12. — Metabolismul triptofanului și formarea acizilor indolici în maladia lui Hartnup. Cînd triptofanul este metabolizat pe calea decarboxilării se formează triptamină, iar din aceasta acidul indolilacetic. În cazul oxidării sau transaminării lui apare acidul indolilpiruvic și acidul indolilacetic, deci cantități sporite de acizi care sînt depistați în urinele acide ale bolnavilor și se formează aceiași produși finali—acidul indolillactic și indolilacetilglutamina. Această cale a metabolismului triptofanului este minoră, dar împiedică formarea de nicotinamidă.

Boala Hartnup *este ereditară* și se datorește unui metabolism anormal al triptofanului, care prin degradarea lui bacteriană duce la formarea de metaboliți indolici fără însemnătate nutritivă și la blocarea

formării de nicotinamidă. Produsele formate în boala Hartnup sînt toxice, (indol, triptamină, feniletilamina, tiramina, amine alifatice), se acumulează temporar în colon și depășesc vremelnic „capacitatea" ficatului de a le neutraliza în cursul procesului de detoxificare. Tratamentul bolnavilor se realizează cu neomicină, deoarece folosirea inhibitorilor monoaminooxidazei este contraindicată în boala Hartnup. S-a propus, de asemenea, folosirea nicotinamidei pentru tratarea bolnavilor dar eficacitatea tratamentului este relativă, puțin evidentă.

19.5. METABOLISMUL AMINOACIZILOR LINIARI RAMIFICAȚI ȘI CU STRUCTURĂ HETEROCICLICĂ

19.5.1 Metabolismul valinei

Biosinteza valinei se realizează din acetaldehidă și acid piruvic, cu participarea tiaminpirofosfatului și a fost studiată în detaliu la microorganisme și fungii. Dehidraza dioxiacizilor intermediari a fost izolată din plante (Kagan, Kretovitch, Tcheyschner, 1963) și necesită pentru activitatea ei ionii de Mn^{2+} și Mg^{2+}. Reacțiile de reducere care sînt însoțite de migrarea simultană a grupărilor metil sau etil (fig. 19.13) decurg datorită și reacțiilor de izomerizare. Reacțiile de reducere pot preceda reacțiile de izomerizare cum este cazul *E. coli* și *Neurospora crassa* care au atît reductaza 2-ceto-3-hidroxiacizilor cît și reductoizomeraza 2-ceto-3-oxiacizilor.

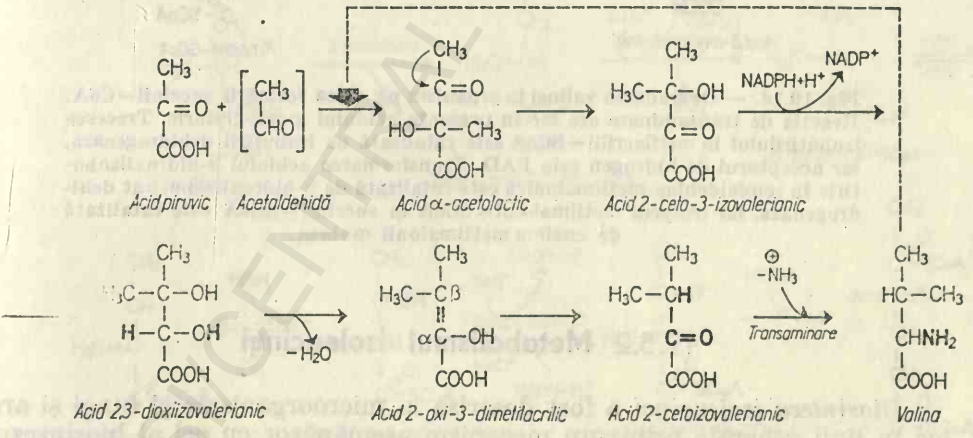


Fig. 19.13. — Biosinteza valinei.

Degradarea valinei prin oxidare conduce la formarea de metilmalonil SCoA care este transformat în succinil ~SCoA, ce poate fi complet oxidat. Compusul intermediar întîlnit în procesul de degradare al valinei acidul

β-aminoizobutiric (fig. 19.14), este prezent în urina bolnavilor și poate servi ca un indicator al metabolismului valinei (v. mai departe).

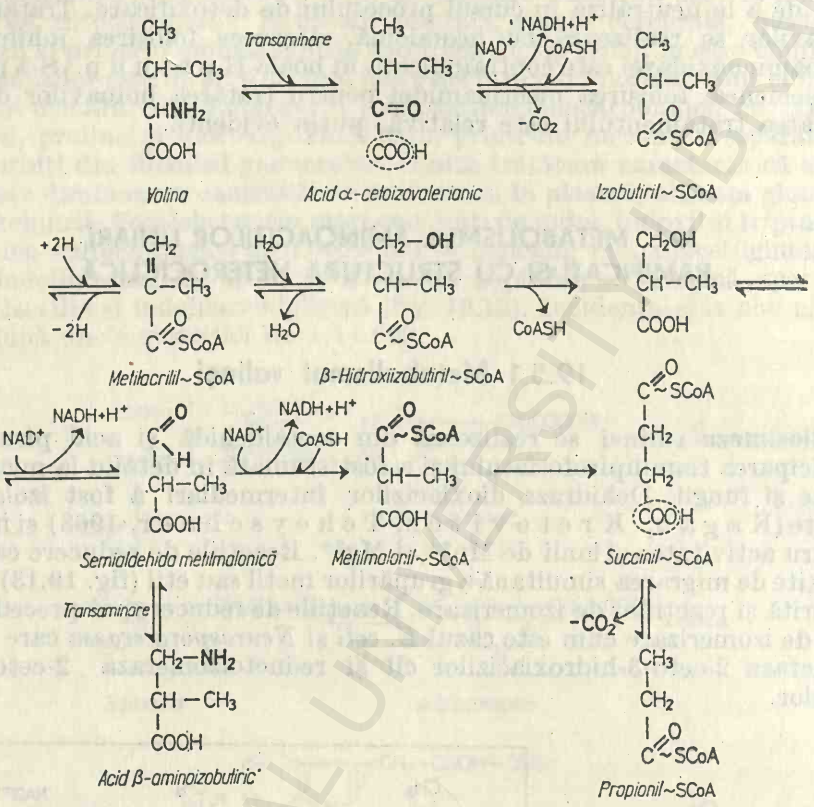


Fig. 19.14. — Degradarea valinei în organism pe calea formării succinil~CoA. Reacția de transaminare are loc în prezența acidului α-cetoglutaric. Trecerea izobutirilului în metilacrilil~SCoA este catalizată de izobutiril dehidrogenaza, iar acceptorul de hidrogen este FAD. Transformarea acidului β-hidroxiizobutiric în semialdehida metilmalonică este catalizată de β-hidroxiizobutirat dehidrogenaza, iar trecerea metilmalonil~SCoA în succinil~SCoA este catalizată de enzima metilmalonil mutaza.

19.5.2 Metabolismul izoleucinei

Biosinteza izoleucinei a fost descrisă la microorganisme și fungi și are loc în linii generale printr-un mecanism asemănător cu cel al biosintezei valinei (fig. 19.15), dar *degradarea izoleucinei* are loc cu formare de acetil~SCoA și propionil~SCoA (fig. 19.16).

Acidemia izovalerianică, caracterizată prin *acidoză, stări de vomă, letargie și comă* se datorește unei concentrații extrem de mari în lichidele biologice (de peste 1 500 ori mai mari) a acidului izovalerianic, ca urmare a

deficienţei de acildehidrogenază care catalizează transformarea izovaleril-CoA în β-metilcrotonil-CoA şi reprezintă de fapt o dereglare fundamentală a metabolismului acizilor graşi (v. capitolul 17). Maladia se combate prin restricţia completă a proteinelor din dietă şi prin infuzii cu glucoză.

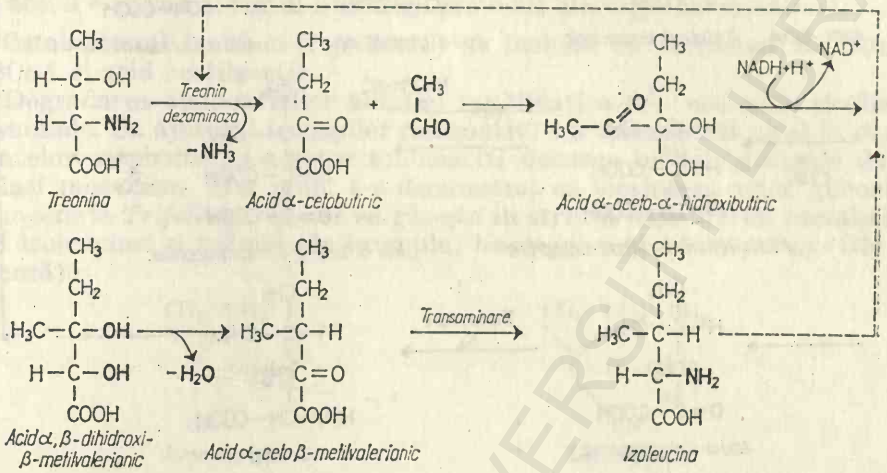


Fig. 19.15.— Biosinteza izoleucinei la microorganisme şi fungi. Cu excepţia reacţiei de deshidratare celelalte reacţii nu au fost descrise la plante.

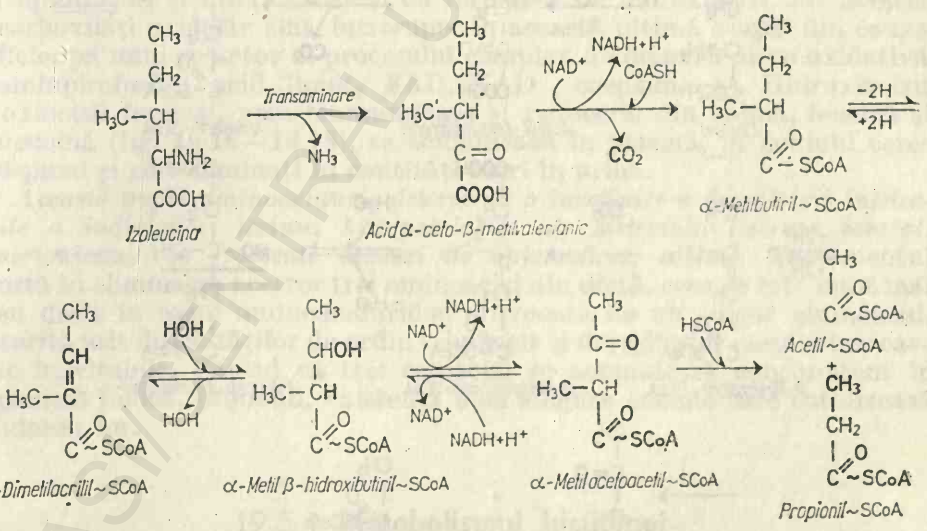


Fig. 19.16. — Degradarea izoleucinei. Acceptorul de hidrogen în reacţia de transformare a α-metilbutiril~SCoA în 2,3-dimetilacrilil~SCoA este FAD oxidat, iar enzima care catalizează ultima reacţie, de scindare a α-metilacetoacetil~SCoA cu formare de acetil~şi propionil~SCoA este α-metilacetoacetil~SCoA tiolaza.

52 — c. 636

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

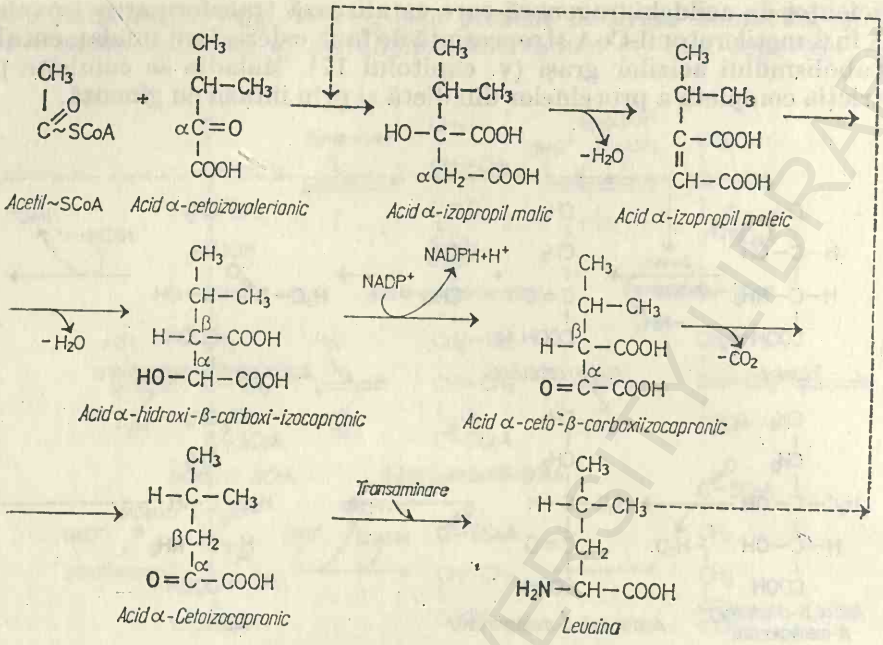


Fig. 19.17. — Biosinteza leucinei.

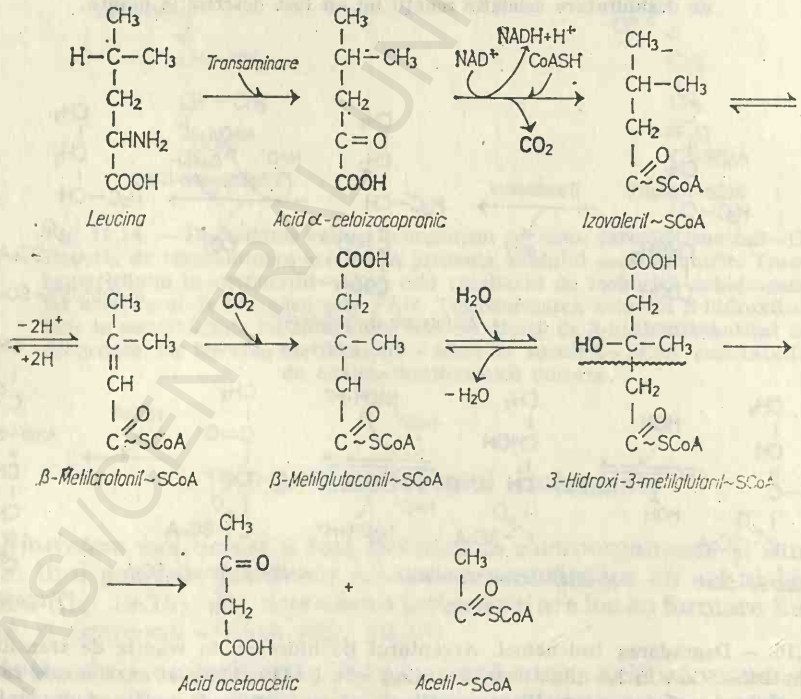


Fig. 19.18. — Degradarea leucinei în organism.

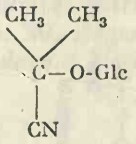
BCU IASI/CENTRU UNIVERSITY LIBRARY

19.5.3 Metabolismul leucinei

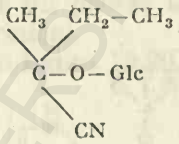
Biosinteza leucinei la plante este necunoscută. La microorganismul *E. coli* ea se realizează prin condensarea acidului α-cetoizovalerianic cu acetil ~ SCoA (fig. 19.17), în timp ce la *Torulopsis utilis* se sintetizează din acetil ~ SCoA și restul izobutiril provenit din degradarea valinei.

Catabolismul leucinei (fig. 19.18) se încheie cu formarea de acetil ~SCoA și acid acetilacetic.

Degradarea aminoacizilor alifatici ramificați a fost mai bine studiată la animale. Cu ajutorul izotopilor radioactivi s-a demonstrat că și în cazul plantelor catabolismul acestor aminoacizi decurge în linii generale după același mecanism. Mai mult, s-a demonstrat că biosinteza unor glicozide cianogene la *Trifolium repense* se găsește în strînsă legătură cu metabolismul izoleucinei și valinei, de exemplu, *linamarina* și *lotaustralina* (Glc = glucoză) :



Linamarina



Lotaustralina

Aminoaciduriile datorate prezenței aminoacizilor alifatici ramificați se manifestă prin *hipertonicitate musculară, stări de vomă, miros caracteristic și aspect siropos al urinei.* Căile metabolice ale α-aminoacizilor valina, leucina, izoleucina, care sînt transaminați cu formarea α-oxoaminoacizilor corespunzători și ulterior reduși cu formarea de hidroxiacizi, iar aceștia decarboxilați oxidativ sînt întrerupte în această ultimă etapă din cauza deficienței unui cofactor al procesului complex de decarboxilare oxidativă (tiaminpirofosfat, acid lipoic, FAD, NAD^+, coenzima A). Hidroxiacizii și oxiacizii formați, prin transaminare și reducere, din valină, leucină și izoleucină (fig. 19.16—19.18), se acumulează în plasmă, în lichidul cerebrospinal și sînt eliminați în cantități mari în urină.

Această triplă aminoacidurie determină o încetinire a dezvoltării intelectuale a indivizilor, leziuni histopatologice ale sistemului nervos central, hipertonicitate cu frecvente atacuri de opistotonus, eczeme. Tratamentul constă în eliminarea acestor trei aminoacizi din dietă, ceea ce este mult mai greu decît în cazul aminoaciduriilor provocate de un singur aminoacid, datorită atît dificultăților de ordin tehnic cît și dereglărilor metabolice care sînt inevitabile. Faptul că trei cetoacizi se acumulează concomitent în organism indică, probabil, existența unei singure enzime care catalizează oxidarea lor.

19.5.4 Metabolismul histidinei

Biosinteza histidinei a fost îndelung studiată și elucidarea ei a întîlnit numeroase dificultăți, pe de o parte, din cauza particularităților structurale ale acestui aminoacid heterociclic, iar pe de altă parte, din cauza unei căi

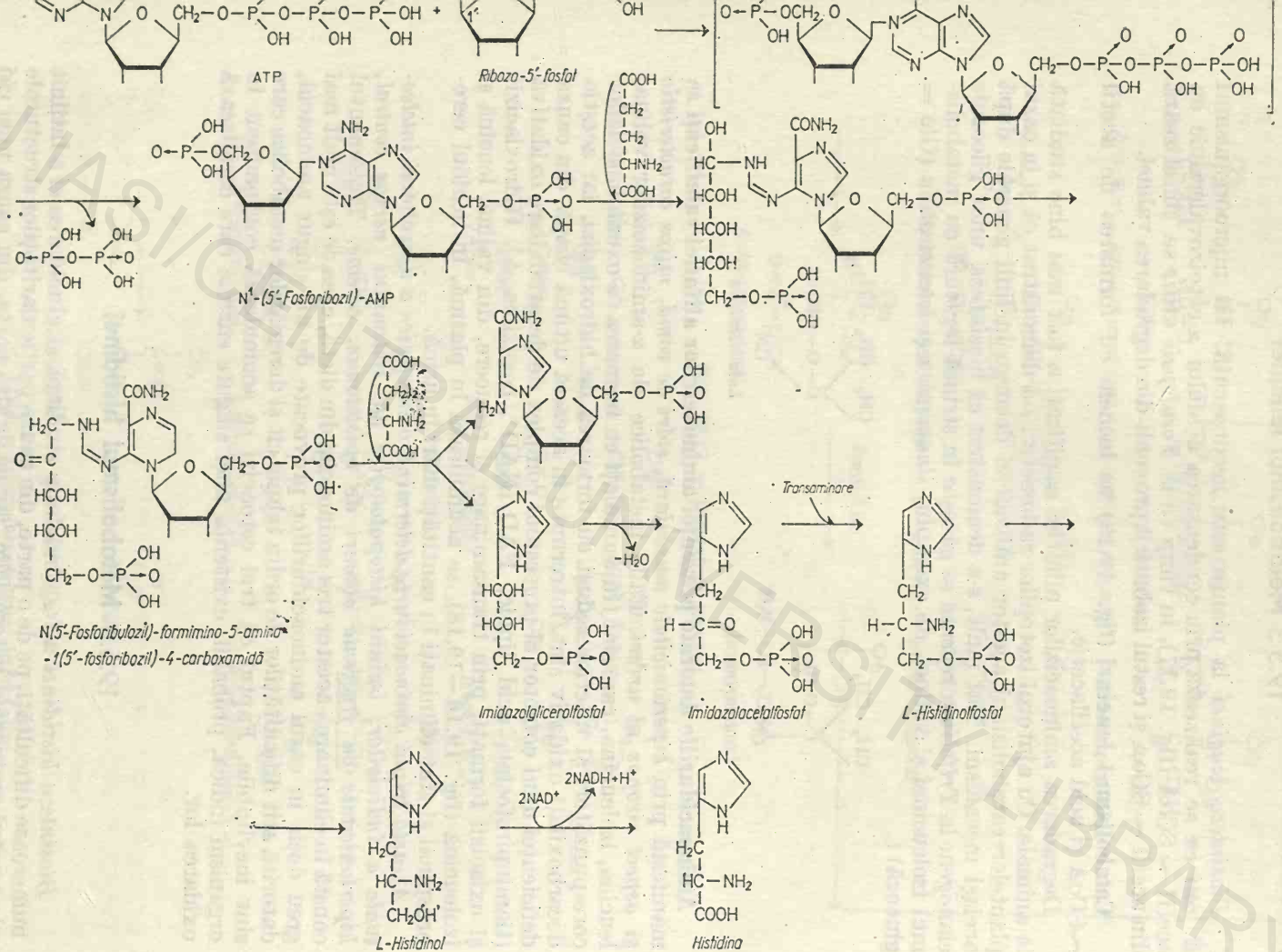


Fig. 19.19. — Biosinteza histidinei.

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

metabolice cu totul particulară, în comparaţie cu biosinteza celorlalţi aminoacizi. Biosinteza histidinei a putut fi stabilită numai pe mutantele de *Salmonella typhimurium* şi ale colibacilului. Prima etapă a acestui proces constă într-o reacţie a ATP cu 5-fosforibozil-1-fosfatul şi este catalizată de *fosforibozil pirofosfat ATP pirofosforilaza* cu formarea compusul N-(5-fosforibozil)-ATP, care conţine două legături N-glicozidice la nivelul atomilor de azot N_1 şi N_9 (fig. 19.19) şi cu eliminare de pirofosfat. Enzima care catalizează această reacţie este allosterică şi este inhibată de prezenţa histidinei în mediul de cultură al microorganismelor. În cazul biosintezei histidinei inhibiţia este coordonată, deoarece excesul aminoacidului în mediu determină o represie a biosintezei tuturor enzimelor care mediază procesul.

După cum se vede din figura 19.19 un atom de azot şi un atom de C al histidinei provin din molecula de ATP, iar restul atomilor de azot din moleculă au ca sursă azotul amidei acidului glutamic. De remarcat că scindarea componentei purinice din ATP este un proces enzimatic neobişnuit (v. şi cap. 20, degradarea bazelor purinice).

Căile de *degradare a histidinei* sînt redate în figura 19.20.

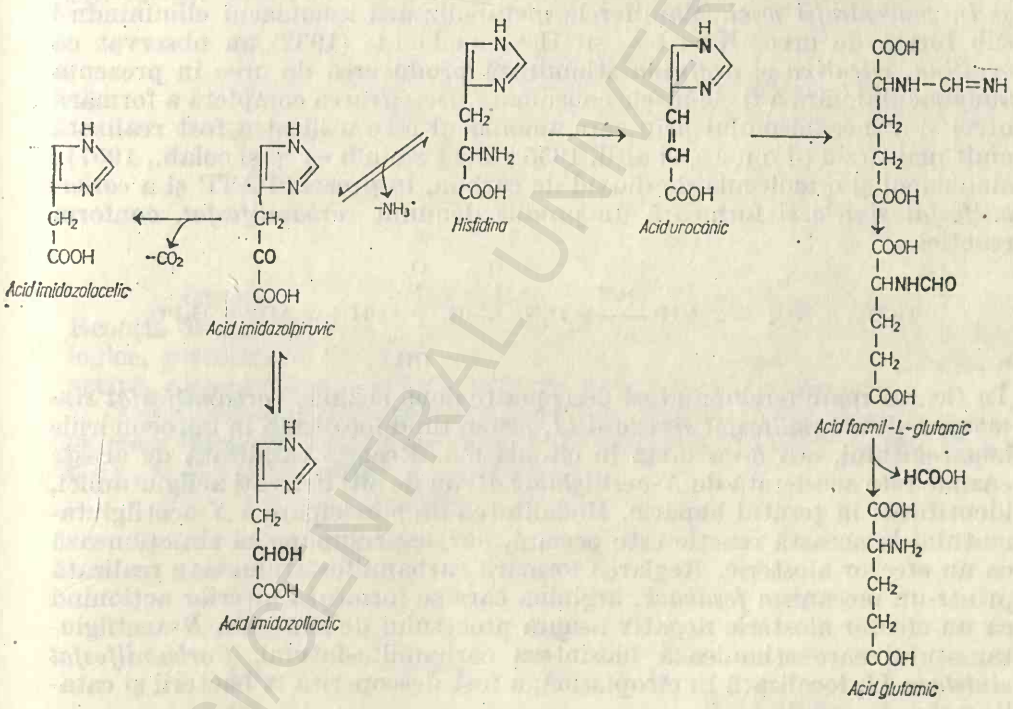


Fig. 19.20. — Degradarea histidinei — cu şi fără deschiderea heterociclului.

Histidinuria se manifestă prin acumularea histidinei (14—17 mg% faţă de 2 mg% în normă) şi acizilor imidazolpiruvic, imidazollactic şi imidazolacetic în lichidele biologice şi eliminarea lor în urină (fig. 19.20). Administrarea intravenoasă de acid urocanic nu determină acumularea acestora în sînge ceea ce demonstrează că deficienţa primară nu constă în

alterarea activității urocanazei, ci a histidazei care catalizează transformarea histidinei în acid urocanic sau a histidin α-dezaminazei.

Degenerarea cerebromaculei sau *boala juvenilă* T a y - S a c h s *maladie recesivă ereditară* este însoțită, de asemenea, de histidinurie și de eliminare masivă de carnozină și anserină, dipeptide care conțin histidină. Cantitatea compușilor biochimici cu nucleu imidazolic în plasma sanguină este normală, ceea ce înseamnă că defecțiunea survine la nivelul tubilor renali.

S-au descris și cazuri de înapoiere psihomotoare datorate, după unii autori (S c h a p i r a și D r y f u s, 1975), unui deficit de formiminotransferază în ficat și în hematii.

19.6 METABOLISMUL AMONIACULUI ȘI SINTEZA UREEI

Amoniacul rezultat în cursul proceselor de dezaminare și din alte procese metabolice ale aminoacizilor este un *compus toxic pentru celule, chiar și în concentrații mici*. Mamiferele metabolizează amoniacul eliminîndu-l sub formă de uree. K r e b s și H e n s e l e i t (1932) au observat că *ornitina*, *citrulina* și *arginina* stimulează producerea de uree în prezența amoniacului, fără a fi ele însele consumate. Descifrarea completă a formării ureei și a mecanismului prin care amoniacul este utilizat a fost realizată mult mai tîrziu (J o n e s și alții, 1955; M e t z e n b e r g și colab., 1957): amoniacul și o moleculă de dioxid de carbon, în prezența ATP și a *carbamilfosfat sintetazei* formează un produs denumit *carbamilfosfat*, conform reacției:

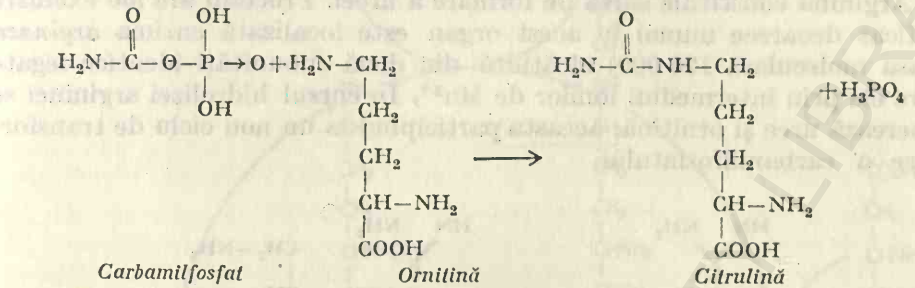
$$HCO_3^- + NH_4^+ + 2\ ATP \xrightarrow{Mg^{2+}} H_2N-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-O-\overset{\overset{O}{\uparrow}}{\underset{\underset{OH}{|}}{P}}-OH + 2\ ADP + H_3PO_4$$

În ficatul mamiferelor au fost descoperite două enzime, *carbamilfosfat sintetaza I* și *carbamilfosfat sintetaza II*, prima fiind localizată în mitocondriile hepatocitului, cea de a doua în citoplasmă. Reacția catalizată de aceste enzime este accelerată de *N-acetilglutamat* sau de alți derivați acilglutamici, identificați în țesutul hepatic. Modalitatea de participare a *N*-acetilglutamatului la această reacție este neclară, dar se presupune că el acționează ca un efector alosteric. Reglarea formării carbamilfosfatului este realizată printr-un mecanism *feedback*, arginina care se formează ulterior acționînd ca un efector alosteric negativ asupra procesului de sinteză a *N*-acetilglutamatului care stimulează biosinteza carbamilfosfatului. *Carbamilfosfat sintetaza II*, localizată în citoplasmă, a fost descoperită la bacterii și catalizează și reacția:

$$\textit{L-Glutamină} + HCO_3^- + 2ATP + H_2O \xrightarrow{Mg^{2+},\ K^+} H_2N-CO-O-\overset{\overset{O}{\nearrow}}{\underset{\underset{OH}{\searrow}}{P}}-OH + 2\ ADP + H_3PO_4 + \text{L-}\textit{Glutamat}$$

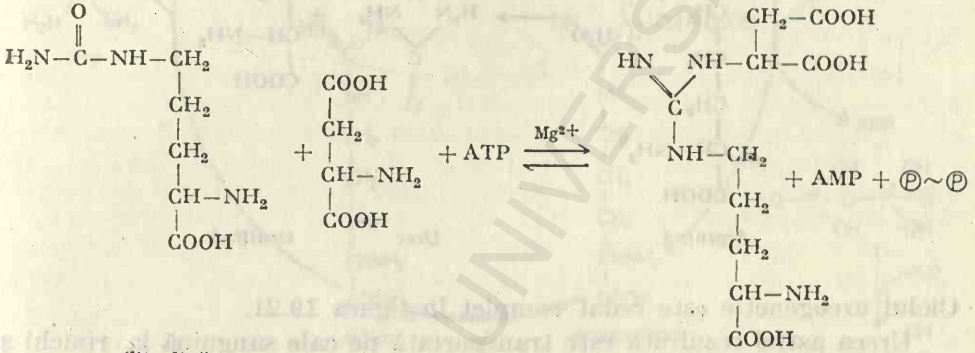
La bacterii formarea carbamilfosfatului are loc în absența *N*-acetilglutamatului și procesul necesită un aport de energie mult mai mic, consumîndu-se o singură moleculă de ATP.

Carbamilfosfatul reacționează ulterior cu *ornitina* cu formare de *citrulină*. Reacția este catalizată de *ornitin transcarbamilaza*:



Carbamilfosfat *Ornitină* *Citrulină*

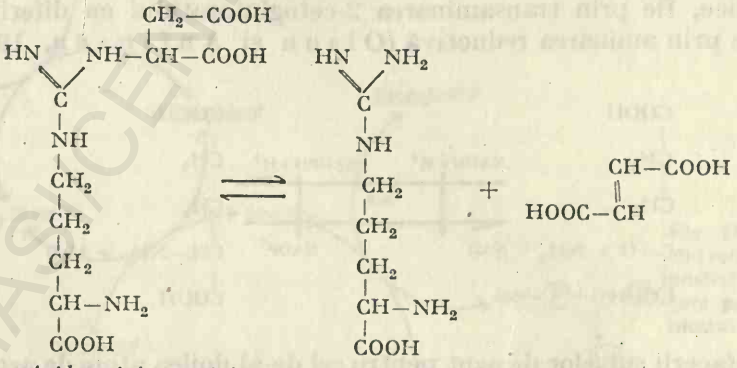
Citrulina, în prezența *argininosuccinat sintetazei*, ATP și Mg^{2+} condensează cu acidul aspartic cu formare de *acid argininosuccinic*:



Citrulină Acid aspartic Acid argininosuccinic

Reacția de mai sus este în principiu ușor reversibilă, dar în condiții fiziologice, pirofosfatul rezultat este hidrolizat de o *pirofosfatază* extrem de activă, ceea ce face ca sensul reacției să fie deplasat spre dreapta.

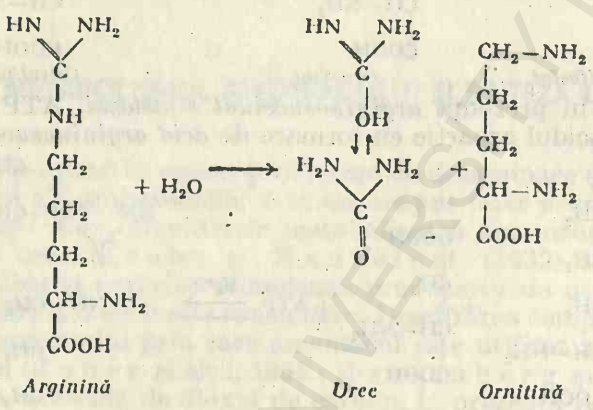
Argininosuccinatul astfel rezultat este hidrolizat de enzima *arginin succinat liaza*, cu formare de arginină și acid fumaric, după reacția (Ratner și alții, 1953, *a*, *b*; 1956):



Acid arginin succinic *Arginină* *Acid fumaric*

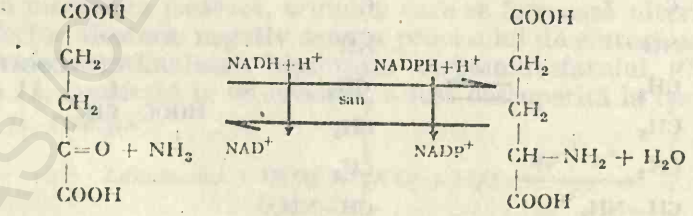
Arginin succinat liaza este o enzimă larg răspîndită în organism şi prezentă în ficat, rinichi şi creier; reacţia catalizată de ea este uşor reversibilă şi are loc în citosol (spre deosebire de reacţiile precedente care decurg în mitocondrii).

Arginina constituie sursa de formare a ureei. Procesul are loc exclusiv în ficat deoarece numai în acest organ este localizată enzima *arginaza* (masa moleculară 120 000) alcătuită din două subunităţi identice legate între ele prin intermediul ionilor de Mn^{2+}. În cursul hidrolizei argininei se eliberează uree şi ornitină, aceasta participînd la un nou ciclu de transformare a carbamilfosfatului.



Ciclul ureogenetic este redat complet în figura 19.21.

Ureea astfel rezultată este transportată pe cale sanguină la rinichi şi eliminată prin urină. Pentru fiecare moleculă de uree formată se foloseşte o moleculă de dioxid de carbon şi o moleculă de amoniac, din care provin atomul de carbon şi un atom de azot. Cel de-al doilea atom de azot din molecula ureei provine de la acidul aspartic care la rîndul lui este regenerat permanent în cursul proceselor de transaminare care au loc între glutamat şi oxaloacetat. Glutamatul, la rîndul lui, este regenerat pe alte două căi metabolice, fie prin transaminarea 2-cetoglutaratului cu diferiţi aminoacizi, fie prin aminarea reductivă (O l s o n şi A n f i n s e n, 1953)



Ciclul refacerii surselor de azot pentru cel de-al doilea atom de azot al ureei este redat schematic în figura 19.22.

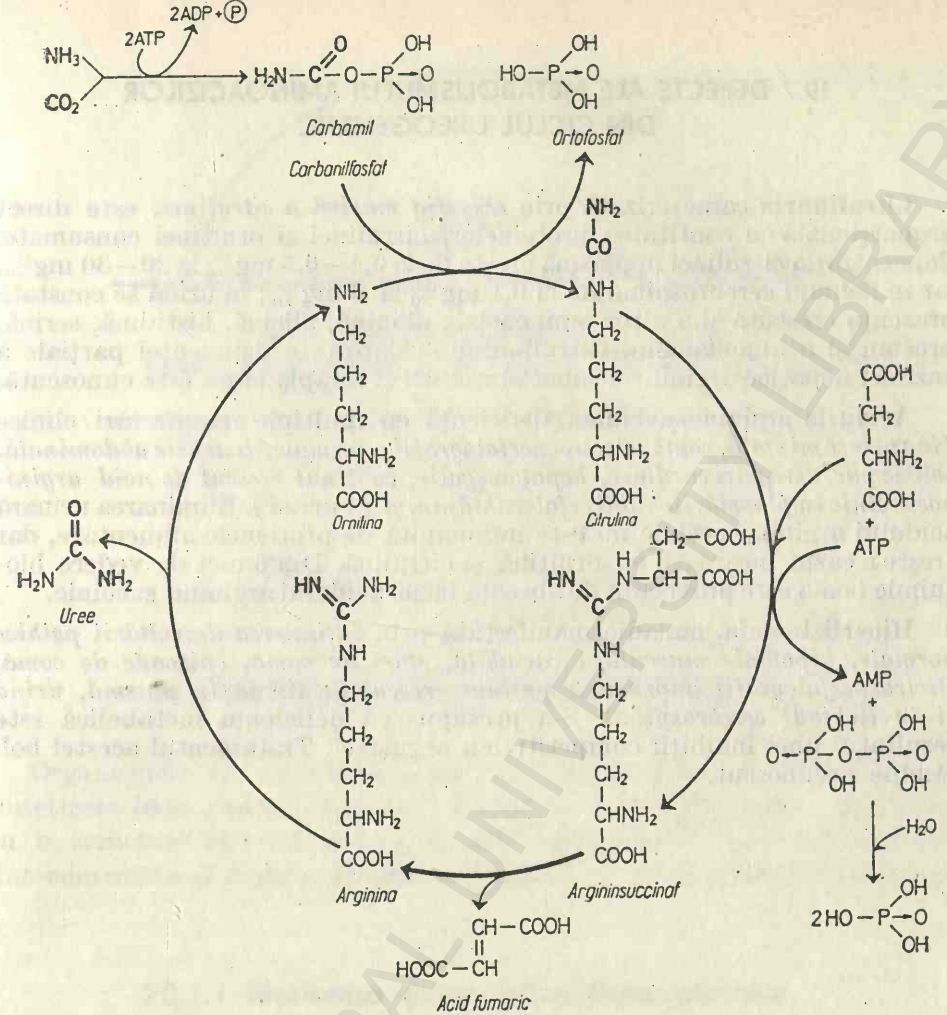


Fig. 19.21. — Ciclul Krebs-Henseleit sau ciclul ureogenezei.

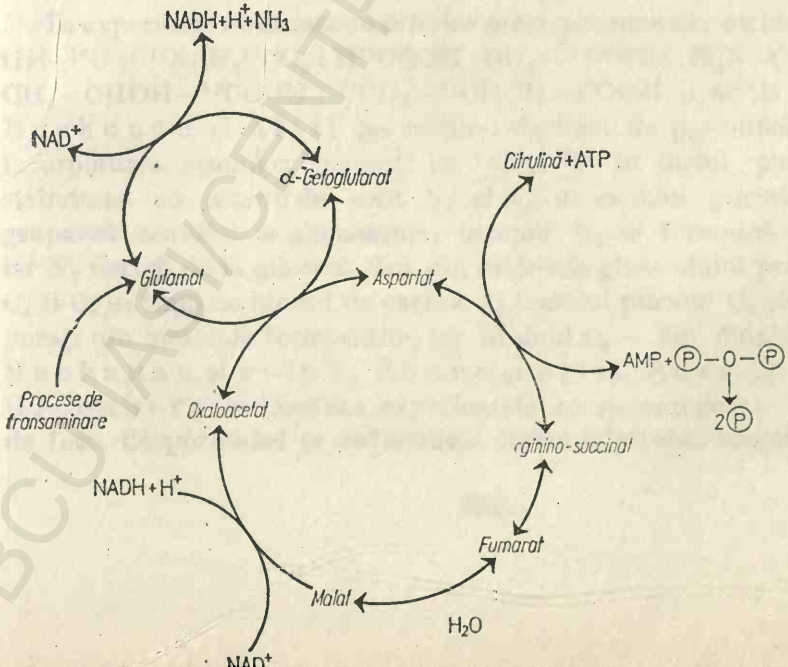


Fig. 19.22. — Ciclul refacerii compușilor azotați care participă la biosinteza ureei.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

19.7 DEFECTE ALE METABOLISMULUI AMINOACIZILOR DIN CICLUL UREOGENETIC

Citrulinuria caracterizată prin *excreţia masivă a citrulinei*, este direct proporţională cu cantitatea proteinelor, citrulinei şi ornitinei consumate. Concentraţia citrulinei în plasmă creşte de la 0,4—0,5 mg% la 20—30 mg%, iar în lichidul cerebrospinal de la 0,1 mg% la 6 mg%; în urină se constată prezenţa crescută şi a altor aminoacizi : alanină, glicină, histidină, serină, precum şi a amoniacului. Citrulinuria se datoreşte deficienţei parţiale a enzimei hepatice arginin succinat sintetaza şi terapia ei nu este cunoscută.

Aciduria argininosuccinică, deficienţă cu multiple manifestări clinice *(înapoiere mintală, vomă, electroencefalografii anormale, distensie abdominală, boli de păr, dereglări cardiace, hepatomegalie, conţinut crescut de acid argininosuccinic în plasmă, lichidul cefalorahidian, şi în urină)*. Eliminarea urinară acidului argininosuccinic nu este influenţată de proteinele alimentare, dar creşte n cazul încărcării cu ornitină şi citrulină. Din punct de vedere biochimic boala este provocată de absenţa liazei acidului arginino succinic.

Hiperlizinemia, maladie manifestată prin *întîrzierea dezvoltării psihice normale, hipotonie musculară variabilă, stări de vomă, episoade de comă, electroencefalografii anormale, conţinut crescut de lizină în plasmă, urină şi în lichidul cerebrospinal.* S-a presupus că deficienţa metabolică este rezultatul unei inhibiţii competitive a arginazei. Tratamentul acestei boli rămîne necunoscut.

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY

20

METABOLISMUL MACROMOLECULELOR ACIZILOR NUCLEICI

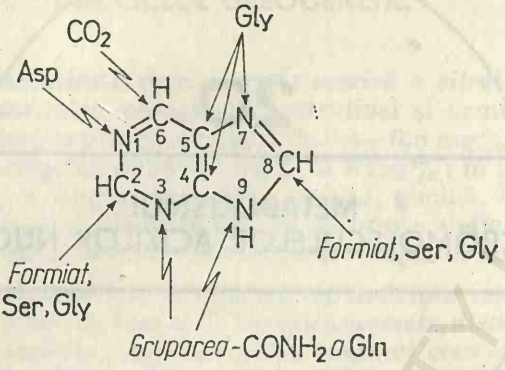
20.1 BIOSINTEZA RIBO-MONONUCLEOTIDELOR

Organismele vii, cu excepția unor microorganisme, sînt capabile să sintetizeze baze azotate purinice și pirimidinice din precursori metabolici cu o structură chimică simplă. Procesele biosintezei mononucleotidelor sînt controlate și reglate pe cale enzimatică de către enzime allosterice.

20.1.1 Biosinteza mononucleotidelor purinice

În experiențe efectuate cu diferite substanțe marcate cu izotopi radioactivi—^{13}C și ^{15}N: $H_2{}^{13}CO_3$; $H^{13}COOH$; $CH_3—{}^{13}COOH$; $H_2N—CH_2—{}^{13}COOH$; $CH_3—CHOH—{}^{13}COOH$; $^{13}CH_3—{}^{13}CHOH—COOH$ și altele — de către Buchanan și alții pe secțiuni de ficat de porumbel, s-a urmărit încorporarea atomilor marcați cu ^{13}C și ^{15}N în inelul purinic, demonstrîndu-se că atomii de azot N_3 și N_9 ai ciclului purinic provin din gruparea amidică a glutaminei, atomul N_1 se formează din aspartat, iar N_7 derivă de la glicocol. Tot din molecula glicocolului provin și atomii C_4 și C_5 în timp ce atomii de carbon ai inelului purinic C_2 și C_8 sînt încorporați din molecula formiatului, iar atomul C_6 — din dioxidul de carbon. Buchanan și colab., Sonne și alții, Shemin și colab., Greenberg au efectuat experiențele lor pe omogenate și pe secțiuni de ficat de porumbel și au analizat radioactivitatea atomilor respectivi

în acidul uric excretat :



Biosinteza bazelor purinice are ca punct de plecare *D-ribozo-5-fosfatul* care în cursul unor reacţii enzimatice succesive este transformat cu formare de *acid inozinic*, produsul final al primei faze a biosintezei. Acesta este ulterior transformat în *acid adenilic* şi în *acid guanilic*.

D-Ribozo-5-fosfatul reacţionează în prima etapă a biosintezei cu ATP dînd naştere *α-5-fosforibozil-1-pirofosfatului* (fig. 20.1) în cursul unui proces de pirofosforilare catalizat de ribozofosfat-pirofosfatkinaza (EC 2.7.6.1). α-5-Fosforibozil-1-pirofosfatul reacţionează cu amida acidului glutamic cu formare de *β-5-fosforibozil-1-amină*, acid glutamic şi pirofosfat. În cadrul acestei reacţii gruparea pirofosforică din poziţia C_1 a pentozei este substituită cu gruparea amidică din glutamină. Reacţia decurge în prezenţa ionilor de Mg^{2+} şi 5-fosforibozil-1-pirofosfatul nu poate fi substituit cu nici un compus asemănător sau similar lui ca structură. *5-Fosforibozil-1-amina* formată cu participarea *amidofosforibozil transferazei* (EC 2.4.2.14) în prezenţa ATP şi Mg^{2+} este capabilă să reacţioneze, prin intermediul grupării $-NH_2$ de la C_1 al ribozei, cu o moleculă de glicocol formînd un *glicinamid ribonucleotid* în care legătura N—C ce uneşte restul de *D*-riboză cu restul de glicocol este sub forma anomerică β şi reprezintă viitoarea legătură glicozidică din nucleotidul ce va fi biosintetizat. Reacţia este catalizată de *fosforibozil glicinamid sintetaza* (EC 6.3.1.3).

Glicinamid ribonucleotidul astfel format acceptă o grupare *formil* de la acidul N_5, N_{10}-meteniltetrahidrofolic dînd naştere *α-N-formilglicinamid ribonucleotidului* capabil să reacţioneze cu glutamina în prezenţa ATP, ca donor de energie, şi a *fosforibozilglicinamidformil- transferazei* şi să formeze un *α-N-formilglicinamidin ribonucleotid* (reacţia 5), produs care posedă o catenă laterală de cinci atomi care vor da naştere la viitorul nucleu imidazolic al purinei.

Prin eliminarea unei molecule de apă şi cu participarea ATP se formează un *5-aminoimidazol ribonucleotid*, care ulterior trece, în prezenţa *fosforibozilaminoimidazol-carboxilazei* (EC 4.1.1.21), prin fixarea de dioxid de carbon, în 5-amino-4-carboxiimidazolribonucleotid. Sistemul enzimatic care catalizează formarea 5-aminoimidazolribonucleotidului este

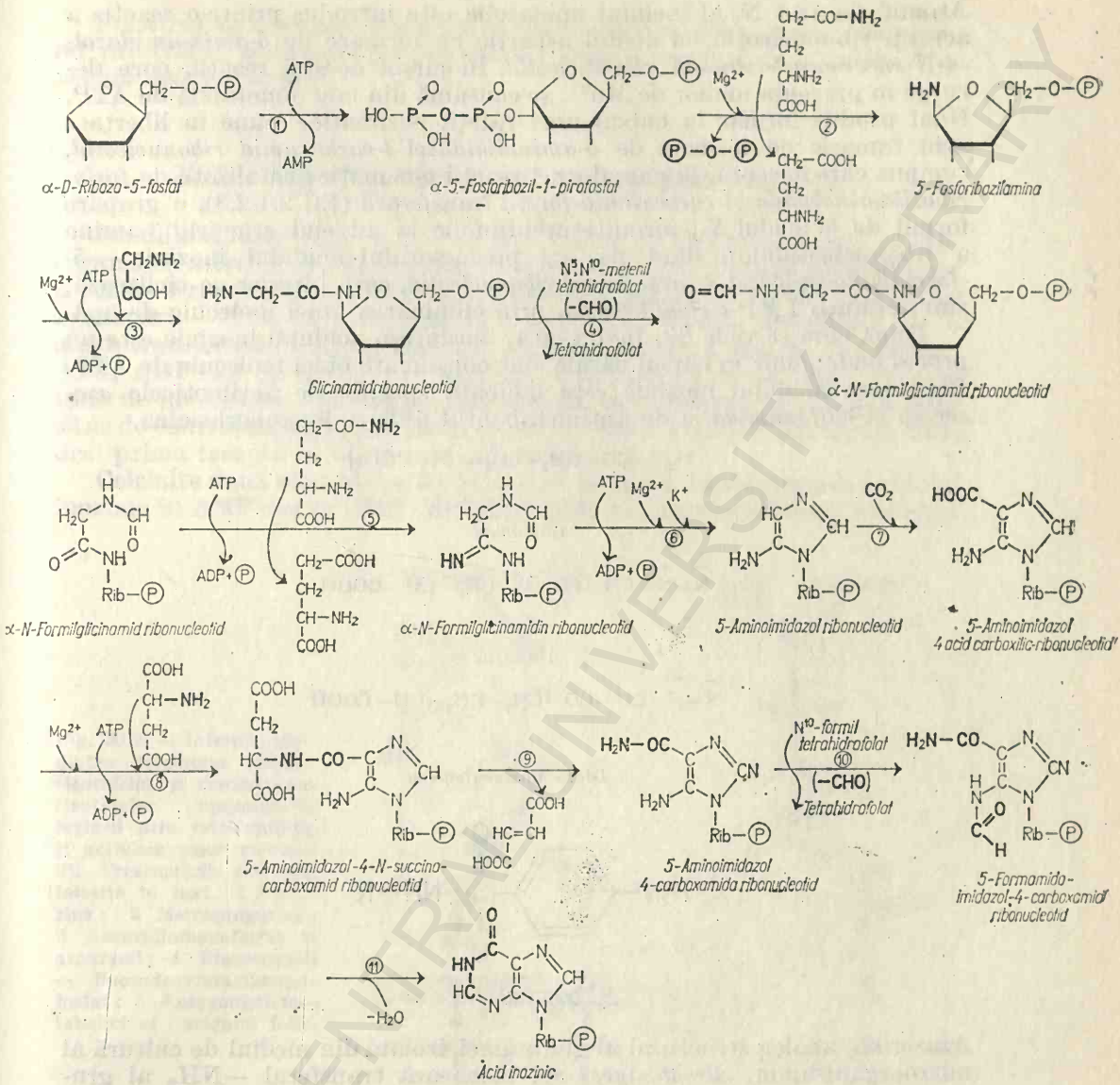


Fig. 20.1. — Biosinteza mononucleotidelor purinice.

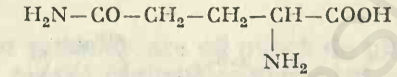
alcătuit din două componente care pot media formarea treptată a compusului în reacțiile *a* și *b* :

a Formil-glicinamidribonucleotid + ATP + Glutamină + H_2O $\xrightarrow{\text{Componenta I}}$ Formil-glicinamidinribonucleotid + ADP + Ⓟ + acid glutamic

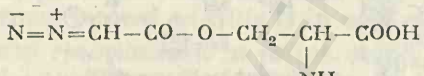
b Formil-glicinamidinribonucleotid + ATP $\xrightarrow{\text{Componenta II}}$ 5-Aminoimidazolribonucleotid + ADP + Ⓟ

Atomul de azot N_1 al inelului imidazolic este introdus printr-o reacție a acestui ribonucleotid cu acidul aspartic cu formare de *5-aminoimidazol--4-N-succinocarboxamidă ribonucleotid*. În cursul acestei reacții, care decurge în prezența ionilor de Mn^{2+}, se consumă din nou o moleculă de ATP. Noul produs format în cursul unei reacții enzimatice pune în libertate acid fumaric cu formare de *5-aminoimidazol-4-carboxamid ribonucleotid*, compus care acceptă, în cursul unei reacții enzimatice catalizate de *fosforibozilaminoimidazol carboxamid-formil transferază* (EC 2.1.2.3), o grupare formil de la acidul N_{10}-formiltetrahidrofolic la nivelul grupării 5-amino a ribonucleotidului, dînd naștere precursorului acidului inozinic — *5--formamido-imidazol-4-carboxamid ribonucleotid*, care ulterior se ciclizează, sub acțiunea *IMP-ciclohidrolazei*, prin eliminarea unei molecule de apă.

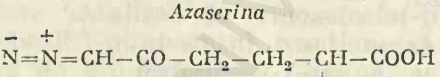
După cum se vede din figura 20.1, biosinteza acidului inozinic este un proces endergonic în cursul căruia sînt consumate cinci molecule de ATP. Biosinteza acidului inozinic este inhibată specific de antibioticele *azaserina* și *sulfonamida* și de antimetabolitul 6-diazo-5-oxonorleucina.



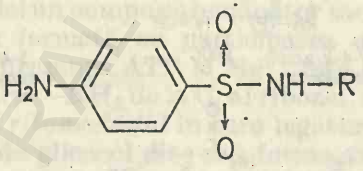
Glutamina



Azaserina



6-Diazo-5-oxonorleucina



Sulfonamidă

Azaserina, analog structural al glutaminei, izolată din mediul de cultură al microorganismului *Streptomyces sp.* blochează transferul $-NH_2$ al grupării amido de la glutamină la 5-fosforibozil-1-pirofosfat, acționînd ca un inhibitor competitiv (Figura 20.1 reacția 2), dar și transferul $-NH_2$ al grupării amido al glutaminei la α-N-formilglicinamid ribonucleotid (Figura 20.1 reacția 5). Se presupune că mecanismul de acțiune al azaserinei se realizează prin intermediul modificărilor în acțiunea catalitică a transferazelor. După un mecanism similar acționează și 6-diazo-5-oxonorleucina.

Sulfonamidele, analogi structurali ai acidului *p*-aminobenzoic, aminopterina și ametopterina blochează etapele de formilare în care intervin acizii meteniltetrahidrofolici.

Folosirea în terapeutică a antagoniștilor acidului folic pentru tratamentul cancerului se bazează pe capacitatea acestor compuși de a inhiba biosinteza acizilor nucleici.

20.1.2 Reglarea biosintezei nucleotidelor purinice

Studiile efectuate pe *E. coli* au demonstrat existența la aceste microorganisme a trei mecanisme diferite de control a biosintezei nucleotidelor purinice. Primul mecanism de control intervine la nivelul reacției de transfer a grupării $-NH_2$ la 5-fosforibozil-1-pirofosfat, reacție catalizată de o amidotransferază, enzimă reglatoare inhibată de două serii de nucleotide : ATP, ADP sau de AMP, precum și de GTP, GDP sau de GMP. Fiecare serie de nucleotide, care au la bază adenina sau guanina, acționează la un situs de control separat, stopînd prin retroinhibiție reacția 1 din figura 20.1, deci prima treaptă în biosinteza nucleotidelor.

Celelalte două mecanisme de control se referă la transformarea acidului inozinic în AMP sau în GMP (fig. 20.2). Cînd acidul inozinic este transfor-

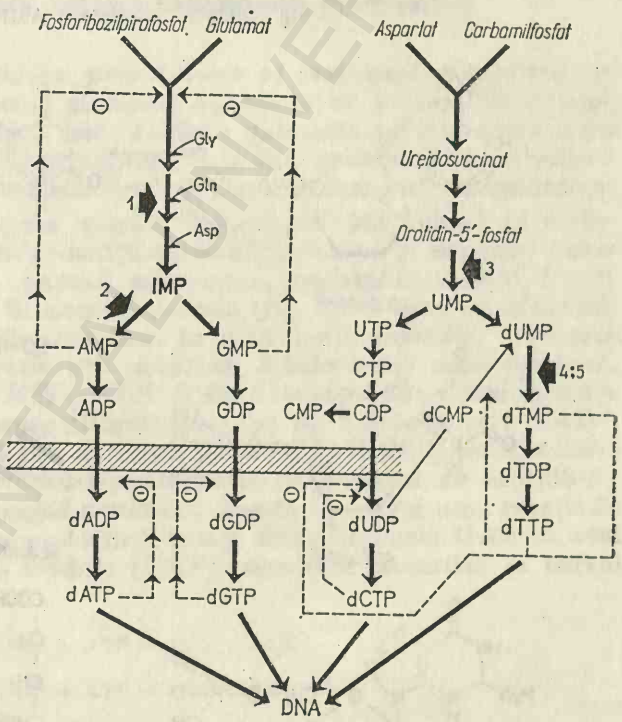


Fig. 20.2. — Interrelațiile dintre biosinteza ribonucleotidelor și deoxiribonucleotidelor, mecanismele reglării prin retroinhibiție și acțiunea unor metaboliți. Prescurtările sînt cele folosite în text. 1 Azaserina ; 2 Mercaptopurina ; 3 Azauridinmonofosfat și azauracil ; 4 Fluorouracil — fluorodeoxiuracilmonofosfat ; 5 Antagoniștii metabolici ai acidului folic.

mat enzimatic în GMP este nevoie de ATP în calitate de cofactor, iar cînd se transformă în AMP este nevoie de GTP. De aceea în cazul în care ATP este prezent în exces, biosinteza de GMP va fi accelerată și invers, în prezența unui exces de GTP în celulă se va acumula AMP. Al treilea mecanism

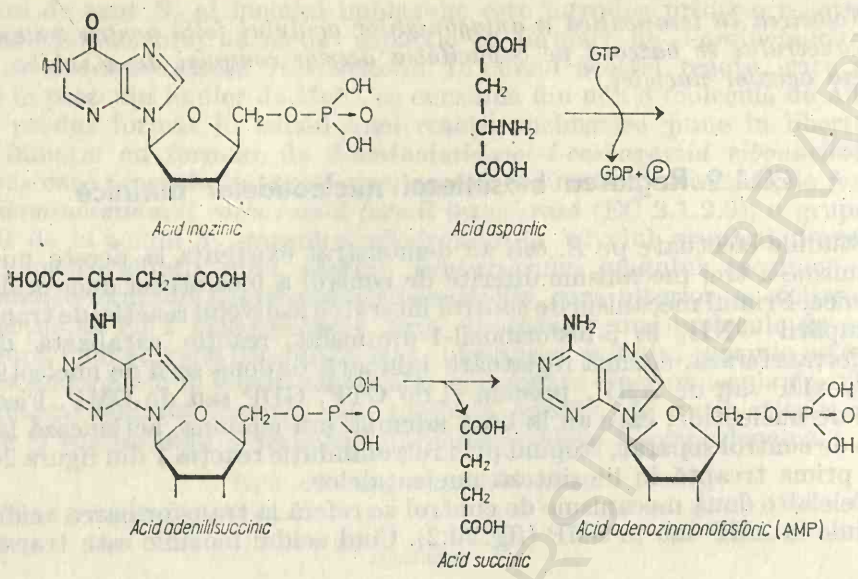


Fig. 20.3. — Biosinteza AMP.

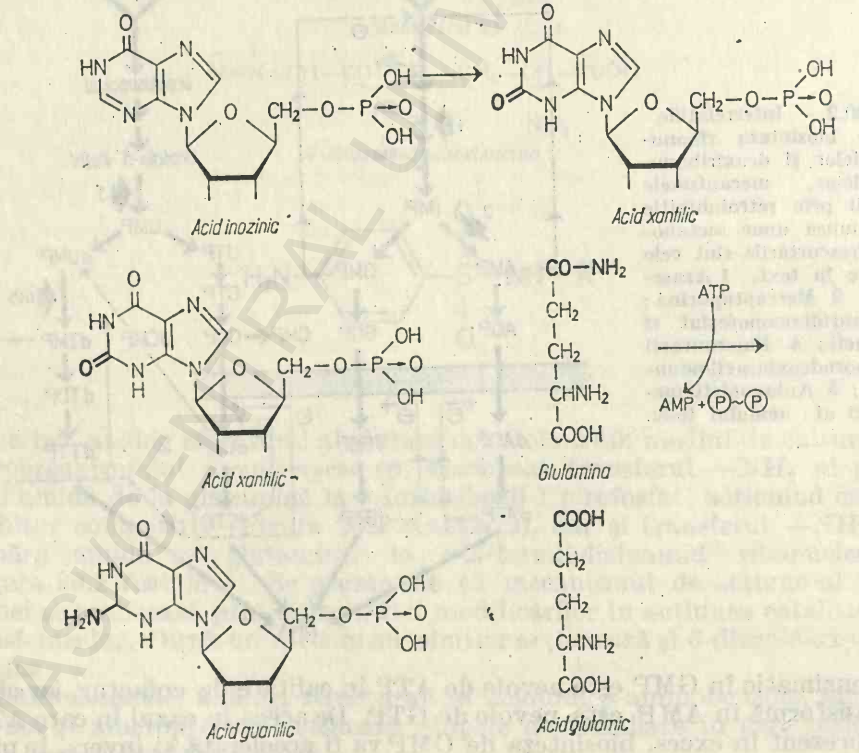


Fig. 20.4.— Biosinteza acidului guanilic.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

de control se întîlnește în cazul în care în mediu este prezent un exces de GMP care inhibă allosteric transformarea acidului inozinic în acid adenilo-succinic și calea formării AMP este astfel blocată.

Biosinteza acidului adenilic AMP se realizează plecînd de la acidul inozinic care reacționînd cu o moleculă de acid aspartic formează *acid adenilo-succinic*. Reacția este endergonică și are loc în prezența GTP, restul acidului succinic fiind fixat la nivelul atomului C_6 al acidului inozinic. Acidul adenilosuccinic este transformat în acid adenilic prin eliminarea acidului fumaric (fig. 20.3).

Biosinteza acidului guanilic GMP decurge în două etape distincte. În prima etapă acidul inozinic este dehidrogenat cu formare de *acid xantilic*, iar acesta este ulterior aminat cu formare de acid guanilic. Energia necesară procesului de aminare este furnizate de ATP (fig. 20.4).

Biosinteza GTP și *ATP* se realizează în prezența fosfokinazelor — nucleozid monofosfokinaza și nucleozid difosfokinaza. O parte importantă a acestor componenți celulari rezultă și în cursul proceselor de metabolism intermediar.

20.1.3 Biosinteza mononucleotidelor pirimidinice

Biosinteza mononucleotidelor pirimidinice se realizează din precursori cu moleculă mică, componenta glucidică legîndu-se de nucleul pirimidinic după biosinteza acestuia. Ea a fost studiată îndeosebi pe microorganisme și pe mutanți ai acestora. Se presupune că în linii generale sinteza pirimidinelor în țesuturile vertebratelor decurge după un mecanism asemănător.

Prima etapă în biosinteza acestor mononucleotide constă în *carboxilarea acidului aspartic* în prezența *carbamilfosfatului* și *aspartat transcarbamilazei* (EC 2.1.3.2), enzimă allosterică, reglatoare. Acidul N-carbamilaspartic care rezultă în această reacție (fig. 20.5) este transformat, prin deshidratare de dihidroorotidază în *acid L-dihidroorotic*, care este ulterior oxidat la *acid orotic* sub acțiunea *dihidroorotat dehidrogenazei*, flavoenzimă care conține FAD, FMN și fier. Reacția de dehidrogenare este puțin obișnuită deoarece ultimul acceptor de hidrogen este NAD^+. Acidul orotic reacționează sub acțiunea orotidin-5′-fosfat pirofosforilazei (EC 2.4.2.10), cu 5-fosforibozil-1-pirofosfatul cu formare de orotidil-5′-fosfat, compus denumit și *acid orotidilic*. Acesta în cursul unei reacții de decarboxilare sub acțiunea orotidin-5′-fosfat decarboxilazei trece în acid uridin-5′-fosforic sau *acid uridilic* (UMP) care este fosforilat în cursul reacțiilor:

$$UMP + ATP = ADP + UDP$$

$$UDP + ATP = UTP + ADP$$

Acidul uridin trifosforic poate fi aminat la atomul C_4 cu formare de acid citidin-5'-trifosforic. Reacția de aminare este endergonică și necesită ATP, iar donorul grupării amino este amoniacul în cazul microorganismului *E. coli* și gruparea amidică a glutaminei, în cazul mamiferelor.

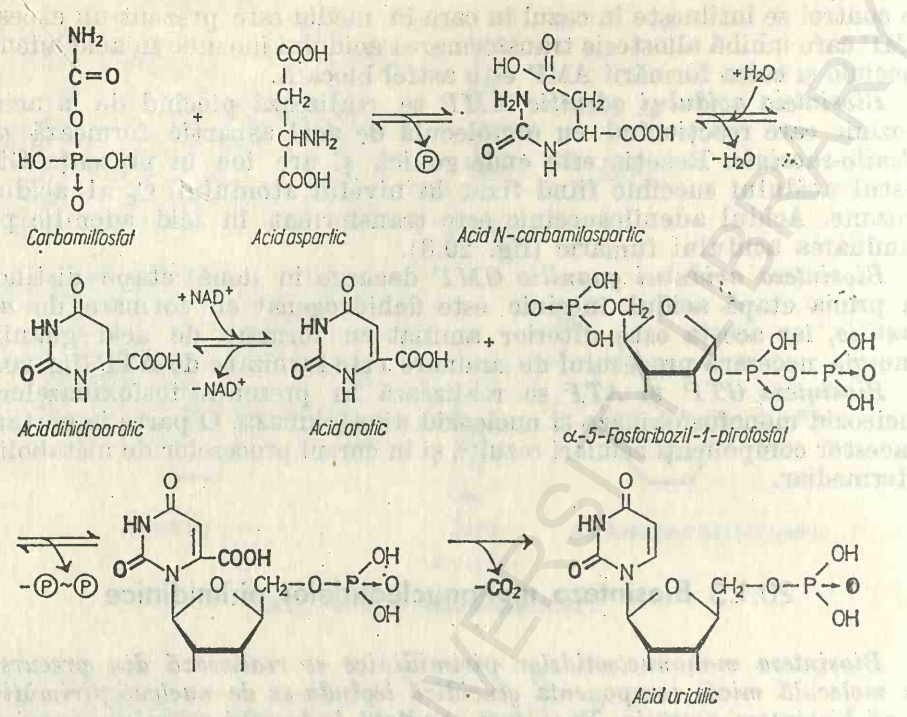


Fig. 20.5. — Biosinteza mononucleotidelor pirimidinice.

Transformarea uracilului în citozină are loc în cursul unei reacţii în care participă *CTP-sintetaza* (EC 6.3.4.2) şi UTP în prezenţa amoniacului :

$$UTP + NH_3 + ATP \longrightarrow CTP + ADP + Ⓟ$$

20.1.4 Reglarea biosintezei ribonucleotidelor pirimidinice

Studiul reglării biosintezei bazelor pirimidinice şi ribonucleotidelor lor a fost efectuat de P a r d e e şi G e r h a r t care au arătat că *aspartat transcarbamilaza*, enzimă care catalizează formarea acidului N-carbamilaspartic este inhibată de CTP, produsul final al acestei biosinteze, precum şi de UTP. Cînd concentraţia carbamil fosfatului este constantă graficul vitezei reacţiei enzimatice are forma unei sigmoide ; dacă se adaugă CTP în concentraţii crescînde afinitatea enzimei faţă de substrat (acidul aspartic) scade. Adăugarea ulterioară de ATP anulează efectul CTP, ceea ce se explică probabil prin faptul că cei doi trinucleotizi concură pentru acelaşi situs allosteric al enzimei (enzima extrasă şi purificată din culturile de *E. coli* are o masă moleculară de 300 000 şi este alcătuită din mai multe subunităţi). Cînd situsul allosteric este legat cu CTP, legarea substratului este anulată şi reacţia enzimatică inhibată, în schimb cînd situsul este ocupat de ATP reacţia de transcarbamilare este stimulată. Din aceste observaţii s-a conchis că ATP nu este un *modulator pozitiv intrinsec*, de

fapt el prevenind numai legarea CTP la situsul allosteric. Studiile ulterioare ale acestei enzime au evidenţiat faptul că acţiunea de modulator negativ a CTP se manifestă în condiţii speciale. Astfel, de exemplu, derivaţii mercurici de tipul *p*-hidroximercuribenzoatului de sodiu determină o creştere a afinităţii enzimei faţă de acidul aspartic, viteza de reacţie reprezentată grafic nu mai are o formă sigmoidă ci alura unei curbe hiperbolice obişnuită pentru enzimele nereglatorii.

Sub acţiunea sărurilor mercurice aspartat transcarbamilaza este „desensibilizată" faţă de modulatorii allosterici, disociind în două tipuri de subunităţi :

— *subunităţi catalitice*, care posedă toată activitatea enzimatică şi nu sînt inhibate de CTP şi

— *subunităţi reglatoare*, care leagă CTP, dar nu posedă activitatea catalitică. Acidul citidin trifosforic inhibă enzima numai cînd cele două tipuri de subunităţi sînt combinate. S-a arătat experimental că aspartat transcarbamilaza conţine şase unităţi catalitice şi şase unităţi reglatoare. Studiul comparat al inhibiţiei aspartat transcarbamilazei izolată din diferite surse a arătat că în cazul microorganismelor *Aerobacter aerogenes* şi *E. coli* modulatorul negativ este CTP, la *P. fluorescens* este UMP, în timp ce la plantele superioare rolul de modulator negativ îl îndeplineşte UMP. Enzima izolată din *B. subtilis* nu este inhibată de nici unul din aceşti modulatori, probabil datorită faptului că şi-a pierdut subunităţile reglatorii.

20.2 BIOSINTEZA DEOXIRIBONUCLEOTIDELOR

Nucleotidele care au în structură deoxiriboză sînt biosintetizate prin *reducerea ribonucleotidelor la carbonul $C_{2'}$ al ribozei*. Reducerea ribonucleotidelor se realizează pe două căi diferite. La celulele de *E. coli* ribonucleotidele ADP, GDP, UDP şi CDP sînt transformate în deoxiribonucleotide *d*ADP, *d*GDP, *d*UDP şi respectiv *d*CDP în cursul unor procese enzimatice la care participă patru enzime diferite; reducerea ribozei la deoxiriboză se face în prezenţa *tioredoxinei*, proteină termostabilă care îndeplineşte rolul de donor de electroni, este alcătuită din 108 resturi de aminoacizi şi are două grupări SH libere care pot fi oxidate cu formarea unei punţi disulfurice. Forma oxidată a tioredoxinei este redusă în prezenţa *tioredoxin reductazei*, donorul de electroni fiind $NADPH+H^+$. Această ultimă enzimă este o flavinenzimă ce conţine două molecule de FAD legat şi are o masă moleculară de 68 000. Cedarea echivalenţilor reducători ai tioredoxinei reduse ribonucleozid-5'-difosfaţilor se face sub acţiunea catalitică a două enzime diferite.

În cazul speciilor din genul *Lactobacillus* sistemul enzimatic care realizează reducerea ribonucleotidelor necesită prezenţa ribonucleozid-5'--trifosfaţilor, a deoxiadenozilcobalaminei în calitate de coenzimă şi probabil, a tioredoxinei reduse.

Biosinteza ***d*TMP** întîlnit în structura DNA se realizează prin metilarea *d*UMP de către enzima *timidilat sintetaza* ce conţine în calitate de coenzimă

N_5, N_{10}-metilentetrahidrofolatul care în timpul reacției cedează atît grupările metil cît și hidrogenul, transformîndu-se în dihidrofolat.

Mecanismul biosintezei deoxiribonucleotidelor din ribonucleotide a fost confirmat experimental în cazul celulelor animale și bacteriene care sînt capabile să utilizeze citidină marcată cu ^{14}C, atît în ciclul pirimidinic cît și în riboză, pentru biosinteza RNA, în care citidina este regăsită sub formă de resturi ale acidului citidilic, iar raportul izotopic ciclul pirimidinic/riboză (sau deoxiriboză) rămîne constant. Acest fapt demonstrează că riboza nu este înlocuită printr-o altă moleculă de deoxiriboză, ci este redusă la nivelul atomului de carbon $C_{2'}$.

Biosinteza deoxiribonucleozid-5′-trifosfaților care sînt utilizați în nucleu pentru biosinteza macromoleculelor de DNA se realizează în cursul unor procese de transfer a grupărilor fosfat, conform reacțiilor:

$$d\text{ADP} + \text{ATP} = d\text{ATP} + \text{ADP}$$

$$d\text{CDP} + \text{ATP} = d\text{CTP} + \text{ADP}$$

$$d\text{TDP} + \text{ATP} = d\text{TTP} + \text{ADP}$$

$$d\text{GDP} + \text{ATP} = d\text{GTP} + \text{ADP}$$

Reglarea biosintezei deoxiribonucleotidelor a fost studiată, îndeosebi, pentru celulele de *E. coli* și se realizează prin mecanism feed-back: reducerea CDP la *d*CDP și a UDP la *d*UDP este puternic stimulată de ATP, în timp ce biosinteza prin reducerea ADP la *d*ADP și a GDP la *d*GDP este accelerată de *d*GTP și respectiv de *d*TTP. Reducerea ribonucleozid-5′--difosfaților, indiferent de baza azotată pe care aceștia o conțin, este puternic inhibată de *d*ATP. Aceeași acțiune inhibitorie au, la concentrații mici ($5 \times 10^{-5} M$), *d*ATP, *d*GTP și într-o măsură mai mică *d*TTP asupra transformării CMP în *d*CMP, CDP în *d*CDP. Experiențele efectuate pe animale de laborator cu hepatectomie parțială și pe culturi de celule ascitice (E r l i c h) au evidențiat faptul că activitatea enzimelor hepatice care participă la reglarea biosintezei deoxiribonucleotidelor atinge în țesutul hepatic în curs de regenerare un maximum după 48 ore de la practicarea hepatectomiei, după care revine la normal. Kinazele care fosforilează timidinnucleotidele cu formare de *d*TTP sînt deosebit de active în țesuturile în care sinteza DNA este bine exprimată (măduva osoasă, glanda tiroidă etc.) și relativ mică în ficat, de exemplu, în care nu are loc diviziunea celulelor.

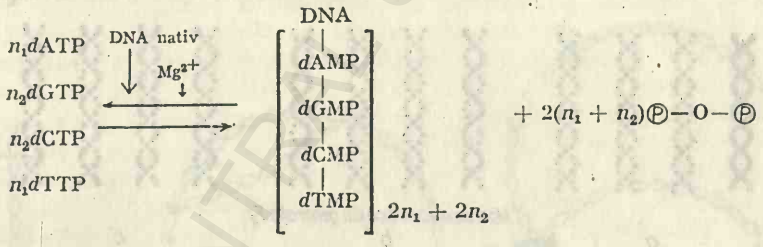
Timidinkinaza, enzima care fosforilează timidina cu formare de *d*TMP este după toate probabilitățile cea care limitează viteza biosintezei DNA. Enzima este inhibată de *d*TTP și CTP, ceea ce înseamnă că *d*TTP prin retroinhibiție reglează activitatea timidinkinazei, dar nu acționează și asupra *d*TMP-kinazei; *d*TTP inhibă transformarea CDP în *d*CDP și dezaminarea *d*CMP ceea ce preîntîmpină acumularea unor mari cantități de *d*TTP care se pot forma fie din deoxitimidină, fie din CDP prin intermediul *d*UMP (v. fig. 20.2).

20.3 BIOSINTEZA ACIDULUI DEOXIRIBONUCLEIC

Printre marile descoperiri ale secolului nostru se numără și stabilirea modelului structural al acizilor nucleici, a mecanismului biosintezei lor și a rolului pe care ei îl îndeplinesc în organismele vii.

Experiențele întreprinse de Beadle și Tatum (1941) cu privire la controlul genetic al reacțiilor biochimice la *Neurospora* au fost continuate în diferite laboratoare și au culminat cu descoperirea lui Avery, McLeod și McCarty (1944) care au demonstrat că *DNA joacă rolul fundamental în transmiterea caracterelor ereditare.* Cercetările ulterioare efectuate de Pollister și Mirsky (1946), Lederberg (1947), Marshak și Calvet (1949), Pauling, Itano, Singer și Wells (1949) și Switf (1950) au confirmat această mare descoperire și au pregătit terenul pentru elaborarea unei ipoteze privind mecanismul transmiterii informației genetice. Suita de lucrări științifice publicate ulterior de Watson și Crick (1953 *a c*), Wilkins, Stokes, Wilson (1953) și Wilkins (1956) a condus la *elaborarea modelului structural dublu helicoidal al macromoleculei de DNA care trebuia să explice mecanismul transmiterii informației genetice.*

Replicarea macromoleculei de DNA. Kornberg, Lehman, Bessman și Simms (1956) realizează pentru prima dată sinteza enzimatică a DNA utilizînd baze azotate purinice și pirimidinice trifosforilate și enzime parțial purificate din culturile de *Escherichia coli.* Kornberg și colab. au arătat că deoxinucleozidtrifosfații în prezența ionilor de Mg^{2+} și a unui sistem acelular complet obținut din *E. coli*, care conținea mici cantități de DNA nativ pot polimeriza după reacția :



Sistemul enzimatic prezent în extractele acelulare de *E. coli* cataliza polimerizarea deoxinucleozidtrifosfaților dacă se îndeplineau următoarele condiții :

— prezența unor mici cantități de DNA nativ, izolat din celulele de *E. coli*, în calitate de „primer", de amorsă a reacției enzimatice. Preparatele de RNA nu sînt capabile să amorseze această reacție ;

— bazele purinice și pirimidinice sub formă de deoxinucleozidtrifosfați sînt absolut necesare în cantități echimoleculare ; ATP stimulează biosinteza DNA ;

— reacția decurge în mod obligatoriu în prezența ionilor de Mg^{2+} ; substituirea lor cu Mn^{2+} schimbă mersul și rezultatul reacției enzimatice ;

— reacția enzimatică este reversibilă deoarece prezența în exces a pirofosfatului determină o depolimerizare a DNA nou sintetizat ;

— în prezența unei amorse de DNA din deoxiribonucleozidtrifosfați sistemul acelular poate sintetiza o cantitate de DNA care depășește de 20 ori cantitatea DNA „primer" sau amorsă;

— moleculele de DNA sintetizate „de novo" respectă *regula lui* Chargaff și au compoziția bazelor azotate apropiată de cea a macromoleculelor de DNA care au servit drept amorsă.

Concluzia acestor experiențe este următoarea : moleculele de DNA primer sau amorsă servesc drept matrice pentru biosinteza unor noi molecule de DNA în cadrul unui proces denumit replicare.

Recunoscîndu-se rolul de matrice al *DNA-primer sau amorsă* replicarea macromoleculei de DNA, teoretic, poate fi realizată după trei mecanisme diferite : *conservativ, semiconservativ* și *dispers* (fig. 20.6).

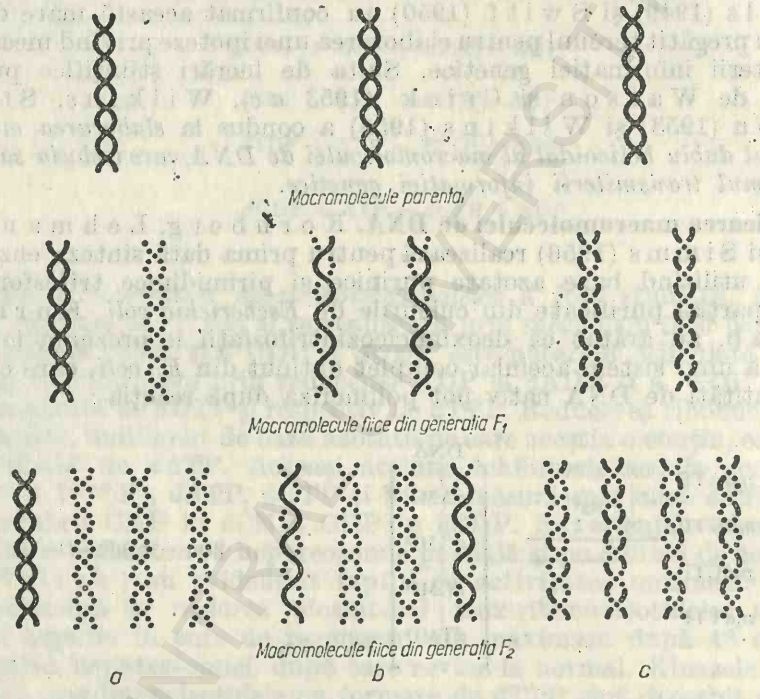


Fig. 20.6. — Replicarea macromoleculei de DNA se poate realiza teoretic după trei mecanisme diferite :

(a) *replicarea conservativă* — fiecare din cele două catene polinucleotidice de DNA sînt replicate fără separarea lor, deci cu conservarea integrală a DNA inițial și cu apariția unor noi molecule de DNA alcătuite din catene polinucleotidice sintetizate *de novo*; (b) *replicarea semiconservativă* — catenele polinucleotidice ale DNA matrice servesc ca tipar pentru biosinteza unor macromolecule fiice, în care o catenă polipeptidică aparține DNA parental, iar cea de a doua este sintetizată *de novo*; (F_1); procesul se repetă în F_2 cînd potrivit mecanismului apar două molecule de DNA sintetizate în întregime *de novo*; (c) *replicarea dispersă* cînd fragmente ale macromoleculelor de DNA parental sînt intercalate în F_1 și F_2 cu fragmente ale catenelor polinucleotidice ale macromoleculelor fiice.

Potrivit modelului dublu helicoidal al moleculei de DNA Watson și Crick au postulat faptul că *replicarea macromoleculei de DNA are loc după mecanismul semiconservativ.* Demonstrația experimentală directă a existenței în organismele vii a acestui mecanism a fost făcută de Mesel-

son şi Stahl (1958) care au cultivat celule de *E. coli* pe medii de cultură care conţineau în calitate de sursă de azot NH_4Cl şi $^{15}NH_4Cl$ (azot normal ^{14}N şi azot greu ^{15}N). Azotul este încorporat în macromoleculele de DNA, obţinîndu-se conform mecanismului semiconservativ ^{14}N-DNA, ^{15}N-DNA şi ^{14}N, ^{15}N-DNA, macromolecule cu mase moleculare diferite şi care pot fi separate prin ultracentrifugare în gradient de CsCl, arbitrar denumite *forme grea, uşoară* şi *intermediară*. Analiza tipurilor de DNA sintetizat în F_1 şi F_2 a confirmat faptul că replicarea semiconservativă a DNA este o realitate.

Taylor (1958), Kornberg (1960), Cairns (1961 şi 1963) au adus ulterior dovezi experimentale privind existenţa mecanismului de replicare semiconservativă a DNA la celulele eucariote, la bacterii şi la bacteriofagi.

Dacă replicarea DNA este de tip semiconservativ următoarea problemă care s-a pus a fost *natura mecanismului replicării macromoleculei de DNA*. În acest scop Cairns a studiat cromozomul bacterian în care DNA este prezent sub formă dublu catenară circulară. Celulele de *E. coli* au fost cultivate într-un mediu ce conţinea timină marcată cu tritiu ^3H şi DNA sintetizat a fost examinat la diferite intervale de timp, prin *metoda autohistoradiografiei* (timina tritiată determină reducerea AgCl de pe placa fotografică la Ag metalic care poate fi vizualizat la microscop). Comparînd imaginile obţinute Cairns ajunge la concluzia că în timpul replicării *cele două catene polinucleotidice ale DNA bacterian nu se separă complet una de alta ci ele sînt separate treptat într-un singur locus în formă de Y care se mişcă treptat de-alungul cromozomului*. Din această cauză cromozomul rămîne tot timpul circular. Catena de DNA nou sintetizată se formează cu o viteză de 27 μ/min., ceea ce corespunde formării a 9×10^4 legături internucleotidice/min. Reprezentarea schematică a acestui proces de replicare a DNA circular bacterian este redată în figura 20.7.

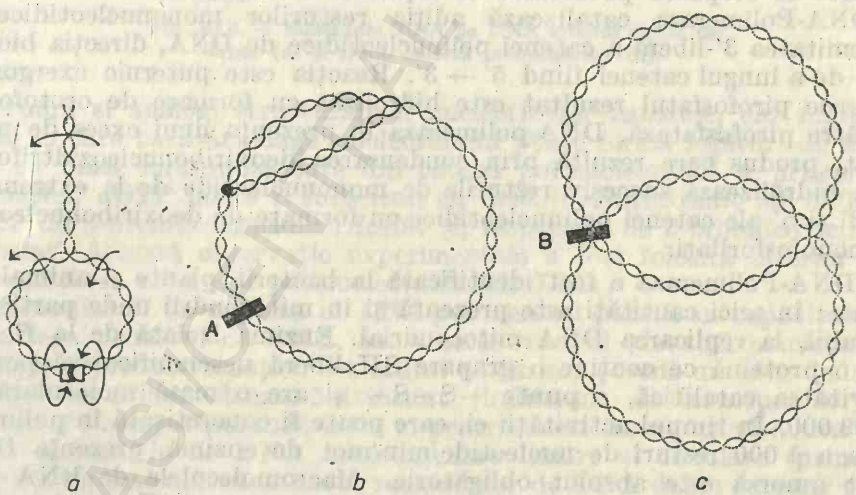


Fig. 20.7. — Replicarea DNA bacterian circular redat după Cairns (1962):
(a) Săgeţile indică direcţiile de rotire în cursul procesului de replicare a moleculei parentale cu formarea unei molecule fiice; (b) şi (c) două stadii consecutive ale replicării cromozomului circular în care literele A şi B indică poziţiile din care începe procesul de replicare.

Cairns presupune *că în timpul replicării cele două catene polinucleotidice se despiralează, ceea ce implică o rotație a moleculei parentale în raport cu molecula fiică care se sintetizează.* Dacă se ia în considerare faptul că molecula de DNA din *E. coli* este replicată în cursul unei singure diviziuni celulare timp de 30 min. atunci despiralarea dublului helix circular trebuie să se realizeze cu o viteză de 10 000 ture/min. Acest fapt a condus la ipoteza existenței mai multor „puncte de creștere", adică *locusi* în care începe sinteza *de novo* a moleculelor fiice.

În modelul *replicon* s-a propus că DNA se replică într-un situs specific al cromozomului denumit *replicator*. Experiențele efectuate pe *E. coli* au arătat că replicarea este inițiată într-un singur situs, dar este dificil de determinat localizarea acestui situs în genom și de a arăta că acest situs este unic. Replicarea cromozomului de *E. coli* se face în ambele direcții cu aproximativ aceeași viteză și se încheie într-un punct diametral opus replicatorului. Este dificil de a afirma că această replicare bidirecțională a DNA este un fenomen larg răspîndit în lumea vie și comun celulelor organismelor superioare (Emmerson, 1974). Replicarea DNA din *Simian virus 40* (SV_{40}) în celulele animale este inițiată, de asemenea, într-un situs specific și este bidirecțională în cromozomul circular, dar replicarea DNA mitocondrial izolat de la șoarece se realizează unidirecțional (Danna, Nathans, 1972; Kasamatsu și Vinograd, 1973).

Mecanismele enzimatice ale replicării DNA. În experiențe *in vitro* Kornberg și colab. au demonstrat că biosinteza DNA este catalizată de DNA-*polimeraza,* enzimă care realizează sinteza legăturilor internucleotidice din amestecuri de *d*ATP, *d*GTP, *d*CTP și *d*TTP. Compușii 5′-di-și-monofosforilați ai bazelor azotate menționate sînt inactivi în această sinteză. Prezența concomitentă a deoxiribonucleotidelor trifosforilate este obligatorie: absența unui deoxiribonucleotid trifosforilat conduce la stoparea procesului de replicare a DNA.

DNA-Polimeraza catalizează adiția resturilor mononucleotidice la extremitatea 3′-liberă a catenei polinucleotidice de DNA, direcția biosintezei de-a lungul catenei fiind 5′ → 3′. Reacția este puternic exergonică deoarece pirofosfatul rezultat este hidrolizat cu formare de orotofosfat de către pirofosfatază. DNA-polimeraza în prezența unui exces de pirofosfat, produs care rezultă prin condensarea deoxiribonucleozidtrifosfaților, hidrolizează succesiv resturile de mononucleotide de la extremitățile 3′ și 5′ ale catenei polinucleotidice cu formare de deoxiribonucleozid-5′-monofosforilați.

DNA-Polimeraza a fost identificată la bacterii, plante și animale în nucleu; în mici cantități este prezentă și în mitocondrii unde participă, probabil, la replicarea DNA mitocondrial. Enzima izolată de la *E. coli* este o proteină ce conține o grupare SH liberă nesemnificativă pentru activitatea catalitică, o punte —S—S— și are o masă moleculară de ~109 000. În timpul activității ei, care poate fi concretizată în polimerizarea a 1 000 resturi de nucleotide/min/mol de enzimă, prezența DNA drept amorsă este absolut obligatorie. Macromoleculele de RNA sînt ineficiente și nu pot substitui DNA-primer sau amorsă. Kornberg și colab. au arătat că DNA-polimeraza necesită prezența unei singure catene polinucleotidice a DNA pentru a realiza sinteza unei catene poli-

nucleotidice complementare. DNA rezultat în urma acţiunii DNA-polimerazei prezintă catene polinucleotidice orientate antiparalel (v. fig. 20.8) ceea ce este în deplină concordanţă cu modelul structural elaborat de Watson şi Crick. Folosind DNA izolat din timusul de viţel şi metoda de *analiză a frecvenţei de baze din vecinătatea cea mai apropiată* Kornberg şi colab. au arătat că DNA format sub acţiunea DNA-polimerazei este complementar tiparului de DNA-primer şi că enzima poate

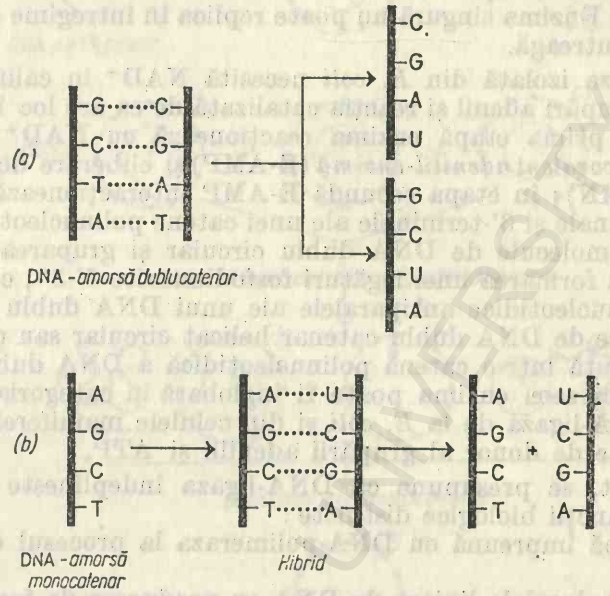


Fig. 20.8. — Biosinteza RNA pe DNA amorsă dublu catenar (a) şi DNA amorsă monocatenar (b).

încorpora şi analogi structurali ai nucleotidelor naturale, dar numai în cazul în care baza analoagă nucleotidului poate forma legături de hidrogen cu baza corespunzătoare din catena polinucleotidică a primerului.

Astfel, *d*GTP poate fi substituit cu deoxiinozintrifosfat, iar *d*TTP şi *d*CTP de 5-bromdeoxiuridintrifosfat şi, respectiv, de 5-bromdeoxicitidintrifosfat. Această observaţie experimentală a fost folosită ulterior pentru marcarea catenelor polinucleotidice ale DNA.

Mecanismul de acţiune al DNA-polimerazei constă în capacitatea ei de a lega primerul de DNA, substratele reacţiei (deoxiribonucleozidtrifosfaţii) şi produşii reacţiei. S-a arătat că enzima posedă un situs de legare pentru deoxiribonucleozid-5'-trifosfat (indiferent de structura lor chimică) care competiţionează între ei pentru acest locus; un al doilea situs leagă moleculele de DNA monocatenare liniare şi circulare (primerii). Enzima nu este activă în cazul moleculelor de DNA dublu catenar circulare intacte, de exemplu, în cazul DNA fagului φX174. *Mecanismul interacţiunilor dintre* DNA-*polimerază şi* DNA *monocatenar asigură marea fidelitate a procesului de replicare a* DNA *celular şi în consecinţă stabilitatea materialului genetic specific speciei respective.*

Numeroase date experimentale realizate prin tehnici de laborator diverse rămîneau neexplicate numai prin intervenţia DNA-polimerazei. De exemplu, cum se realizează biosinteza sau replicarea DNA circular, sub acţiunea cărui factor catena polinucleotidică liniară devine circulară? Aproape concomitent cu cercetările realizate în laboratoarele lui Kornberg, alţi cercetători (1956, 1960, 1961) au descoperit o nouă enzimă care intervine în replicarea DNA pe care au denumit-o DNA-*ligaza*. Această enzimă, izolată din *E. coli*, poate lega extremităţile a două catene de DNA sau extremităţile aceleiaşi catene de DNA cu formarea unei molecule circulare. Enzima singură nu poate replica în întregime o catenă polinucleotidică întreagă.

DNA-Ligaza izolată din *E. coli* necesită NAD^+ în calitate de sursă donoare de grupări adenil şi reacţia catalizată de ea are loc în două etape distincte: în prima etapă enzima reacţionează cu NAD^+ cu formarea unui *complex covalent adenilil-enzimă* (E-AMP) şi eliberare de niacinmononucleotid (NMN); în etapa secundă E-AMP interacţionează cu extremităţile 5′-terminale şi 3′-terminale ale unei catene polinucleotidice sau care aparţin unei molecule de DNA dublu circular şi gruparea adenilil este transferată cu formarea unei legături fosfodiesterice-5′-3′-, care „închide" catenele polinucleotidice antiparalele ale unui DNA dublu catenar helicat cu formare de DNA dublu catenar helicat circular sau care „repară" o eroare apărută într-o catenă polinucleotidică a DNA dublu helicoidal. În acest ultim sens enzima poate fi înglobată în categoria *enzimelor de reparaţie*. DNA-ligaza de la *E. coli* şi din celulele mamiferelor poate utiliza în calitate de donor al grupării adenilil şi ATP.

În prezent, se presupune că DNA-ligaza îndeplineşte în celule cel puţin cinci funcţii biologice distincte:

— participă împreună cu DNA-polimeraza la procesul de replicare a DNA;

— leagă moleculele liniare de DNA cu producere de forme circulare;

— repară catenele polinucleotidice ale DNA;

— leagă fragmente de DNA în procesul de recombinare genetică în timpul transformării, transducţiei şi lizogeniei microbiene;

— la celulele eucariote participă la recombinarea genelor în procesul de crossing-over.

Goulian, Kornberg şi Sinsheimer (1968) au realizat pentru prima dată sinteza in vitro pe cale enzimatică a DNA dublu catenar circular, biologic activ. În acest scop ei au folosit forma replicativă a DNA bacteriofagului φX174 şi preparate purificate de DNA-polimerază şi DNA-ligază. Molecula de DNA a fagului φX174 este circulară şi monocatenară şi ea poate fi copiată de celulele gazdă ale microorganismului *E. coli*. În cursul acestui proces rezultă un DNA circular dublu catenar denumit şi DNA de replicare. Cele două catene polinucleotidice, ale fagului φX 174 şi ale DNA din *E. coli* au fost desemnate prin semnele (+) şi (—) (fig. 20.9) şi sînt infecţioase pentru acest microorganism. Autorii folosesc în experienţele lor, pentru diferenţierea formelor circulare (+) şi (—) marcarea cu tritiu, ^{32}P şi cu 5-bromuracil (în loc de timină). Forma circulară (+) a DNA fagului φX174, marcată cu tritiu, în prezenţa unui amestec de *d*ATP, *d*CTP, *d*GTP şi *d*BUTP (5-bromuracil) marcaţi cu ^{32}P serveşte drept tipar (matrice) pentru DNA-polimeraza care realizează

biosinteza unei catene polinucleotidice liniare, complementare (—) marcată cu ^{32}P și cu bromuracil. Extremitățile acestei catene complementare (—) a DNA φ X174 sînt unite sub acțiunea DNA-ligazei și se formează un DNA dublu catenar circular al fagului φ X174. Această moleculă de DNA a fost tratată cu deoxiribonuclează în scopul de a provoca o „crestă-

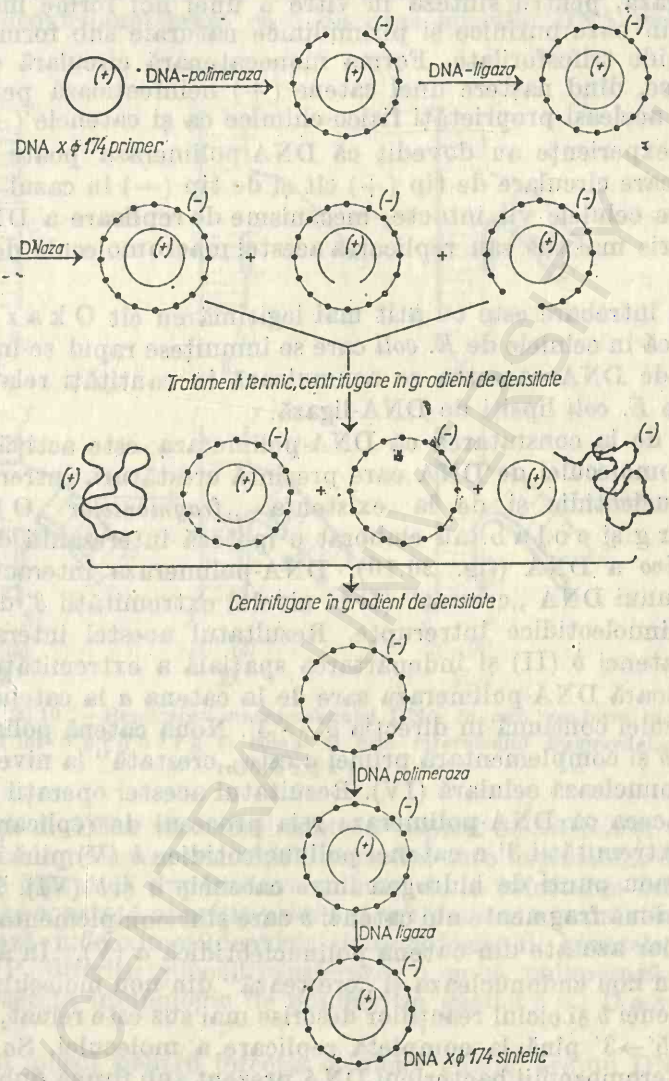


Fig. 20.9. — Sinteza *in vitro* pe cale enzimatică a DNA dublu catenar circular, biologic activ (după G o u l i a n și alții, 1968).

tură" la nivelul catenelor polinucleotidice ale dublului helix spiralat. Despiralarea formelor dublu catenare spiralate a fost realizată prin denaturare termică și printre produșii rezultați au fost indentificate forme monocatenare circulare (+) și (—) intacte, forme liniare (+) și (—) intacte și

fragmente de catene polinucleotidice (fig. 20.9). Deoarece catenele nou sintetizate (—) conţineau 5-bromuracil în loc de timină ele au putut fi separate prin ultracentrifugare în CsCl (marcarea lor cu ^{32}P a constituit o metodă de verificare a gradului de separare completă). Catena circulară (—) sintetizată in vitro şi care conţine 5-bromuracil în locul timinei a fost în continuare utilizată, împreună cu preparatele pure de DNA-polimerază şi DNA-ligază, pentru sinteza in vitro a unei noi forme monocatenare circulare din baze purinice şi pirimidinice naturale sub formă de deoxiribonucleotide trifosforilate. Forma monocatenară circulară (—) s-a dovedit eficace, dînd naştere unei catene (+) neinfecţioasă pentru *E. coli* şi care are aceleaşi proprietăţi fizico-chimice ca şi catenele (+) naturale.

Aceste experienţe au dovedit că DNA-polimeraza poate realiza atît forme catenare circulare de tip (+) cît şi de tip (—) în cazul DNA viral. Posedă oare celulele vii, intacte, mecanisme de replicare a DNA identice cu cel descris mai sus sau replicarea acestei macromolecule decurge după alte legi?

Această întrebare este cu atît mai legitimă cu cît O k a z a k i (1964) a observat că în celulele de *E. coli* care se înmulţesc rapid se întîlnesc mici fragmente de DNA. Acestea se acumulează în cantităţi relativ mari în mutanţii de *E. coli* lipsiţi de DNA-ligază.

Plecînd de la constatarea că DNA-polimeraza este activă numai în cazul macromoleculei de DNA care prezintă crestături, întreruperea lanţului polinucleotidic şi de la existenţa „*fragmentelor* O k a z a k i", K o r n b e r g şi c o l a b. au elaborat o ipoteză interesantă despre replicarea *in vivo* a DNA (fig. 20.10). DNA-polimeraza interacţionează cu catena *b* a unui DNA „crestat" (I) la nivelul extremităţii *3'* de la nivelul catenei polinucleotidice întrerupte. Rezultatul acestei interacţiuni este refacerea catenei *b* (II) şi îndepărtarea spaţială a extremităţii *5'*. Într-o etapă ulterioară DNA-polimeraza sare de la catena *a* la catena *b* şi replicarea moleculei continuă în direcţia $5' \rightarrow 3'$. Noua catenă polinucleotidică sintetizată *b* şi complementară primei *a* este „crestată" la nivelul curburii ei de o endonuclează celulară (IV). Rezultatul acestei operaţii se materializează în aceea că DNA-polimeraza reia procesul de replicare a catenei la nivelul extremităţii 3' a catenei polinucleotidice *b* (V) pînă cînd se formează din nou punţi de hidrogen între catenele *a* şi *b* (VI). DNA-ligaza uneşte cele două fragmente ale catenei *b* care sînt complementare ca structură a bazelor azotate din catena polinucleotidică *a* (V). În această fază intervine din nou endonucleaza şi „crestează" din nou molecula la nivelul curburii catenei *b* şi ciclul reacţiilor descrise mai sus este reluat, permanent în direcţia $5' \rightarrow 3'$ pînă la completa replicare a moleculei. Se postulează faptul că în cromozomii bacterieni DNA prezent sub formă dublu catenară circulară este inert atîta timp cît el nu prezintă „crestături". Ambele catene polinucleotidice ale unei molecule dublu catenare circulare pot fi replicate după mecanismul descris mai sus prin acţiunea combinată şi succesivă a DNA-polimerazei, DNA-ligazei şi a unei endonucleaze intracelulare. Cînd DNA-ligaza este absentă, cum este cazul mutanţilor de

E. coli fragmentele replicate nu mai sînt unite între ele şi se acumulează în celule.

Un caz particular de replicare se întîlneşte la *DNA viral*, cînd în celulele gazdă infectate este replicat, în principal, DNA viral care se deosebeşte de cel al gazdei prin faptul că în loc de citozină conţine oximetilcitozină. Această replicare preferenţială se explică prin aceea că DNA-viral codifică sinteza unei deoxiribonucleaze care distruge specific DNA gazdei, dar

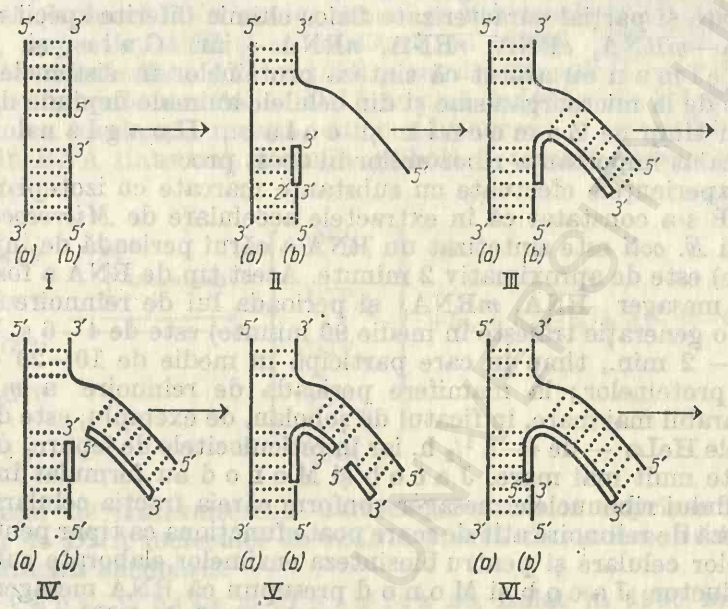


Fig. 20.10. — Replicarea macromoleculei DNA *in vivo*, conform ipotezei lui Kornberg şi colab. şi prin intermediul fragmentelor Okazaki.

este inertă faţă de DNA virusului. Sinteza rapidă de *m*RNA şi îndeosebi de proteine virale necesare înmulţirii virusului este explicabilă dacă se ia în considerare faptul că după cîteva minute de la infectarea celulelor de *E. coli* cu fag se constată apariţia unor noi echipamente enzimatice (kinaza care fosforilează hidroximetildeoxicitidinmonofosfatul, kinazele specifice TMP şi *d*GMP, diferite glicoziltransferaze, o nouă polimerază specifică fagului şi deosebită imunologic de polimeraza gazdei ş.a., Davidson, 1968).

Dacă fagul folosit pentru infecţia celulelor gazdei are un DNA monocatenar, cum este cazul fagului φ X174, atunci acest DNA monocatenar (+) pătrunde în celula gazdei şi dă naştere unei forme replicative dublu catenare helicate după sinteza unei catene complementare (—). Metilarea şi glicolizarea bazelor azotate din DNA viral sînt procese postbiosintetice şi reprezintă, probabil, un proces specie-specific prin care se asigură o protejare a DNA faţă de acţiunea deoxinucleazelor endogene.

20.4 BIOSINTEZA ACIZILOR RIBONUCLEICI

20.4.1 Biosinteza acidului ribonucleic mesager mRNA

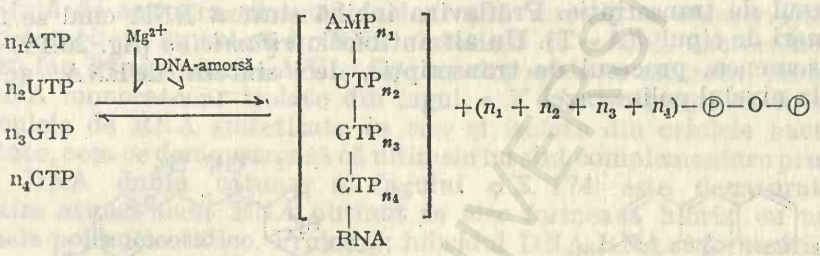
Primele indicaţii cu privire la rolul RNA în sinteza proteinelor au fost obţinute de Caspersson (1942) şi Brachet (1950) care cu ajutorul metodelor histochimice au demonstrat că celulele în care are loc o sinteză intensă de proteine sînt bogate în RNA. Între anii 1950—1961 au fost descoperite şi parţial caracterizate fizico-chimic diferite specii moleculare de RNA—*m*RNA, *s*RNA, *r*RNA, *n*RNA — iar Gale şi alţii şi Spiegelman au arătat că sinteza proteinelor în sistemele acelulare obţinute de la microorganisme şi din celulele animale depinde de prezenţa RNA, în timp ce Zamecnik şi colab., Hoagland şi alţii au semnalat importanţa ribozomilor în acest proces.

În experienţele efectuate cu substanţe marcate cu izotopi radioactivi ^{14}C şi ^{32}P s-a constatat că în extractele acelulare de *Micrococcus lysodeikticus* şi *E. coli* este sintetizat un RNA a cărui perioadă de înjumătăţire (half life) este de aproximativ 2 minute. Acest tip de RNA a fost denumit ulterior mesager RNA, *m*RNA, şi perioada lui de reînnoire la bacterii (la care o generaţie trăieşte în medie 90 minute) este de 4—6 s, la *Bacillus subtilis* — 2 min., timp în care participă în medie de 10—20 ori la biosinteza proteinelor; la mamifere perioada de reînnoire a *m*RNA este incomparabil mai mare, în ficatul de şobolan, de exemplu, este de 8—12 h, în celulele HeLa — de 4—4 $^1/_2$ h, iar în reticulocitele de iepure, după unele date, este mult mai mare. Jacob şi Monod au formulat în 1961 ipoteza acidului ribonucleic mesager conform căreia fracţia celulară de RNA cu o viteză de reînnoire atît de mare poate funcţiona ca tipar pentru sinteza proteinelor celulare şi pentru biosinteza enzimelor elaborate sub acţiunea unui inductor. Jacob şi Monod presupun că RNA mesager care precede sinteza proteinelor este o specie moleculară de RNA care poartă informaţia genetică din DNA cromozomilor din nucleu la nivelul ribozomilor citoplasmatici. Ei postulează că *m*RNA se formează enzimatic, este complementar ca structură primară unui fragment dintr-una din catenele DNA şi conţine informaţia completă pentru biosinteza unei proteine, a uneia sau a mai multor catene polipeptidice.

Hurwitz şi alţii (1960), Weiss (1960), Stevens (1960), Burdon şi Smellie (1961 *a*, *b*), Ochoa şi colab. (1961) au arătat fără echivoc că extractele acelulare nepurificate obţinute din celulele de *E. coli* şi incubate cu ribonucleozidtrifosfaţi marcaţi cu ^{14}C şi ^{32}P sînt capabile să sintetizeze un compus acidoinsolubil şi nedializabil care se comportă ca un RNA. Acest compus nu este atacat de deoxiribonuclează, dar este uşor hidrolizat de ribonuclează şi de diesteraza din veninul de viperă. Prin hidroliză alcalină eliberează cele patru ribonucleotide întîlnite în mod obişnuit în RNA. Încorporarea optimă a ribonucleozidtrifosfaţilor în moleculă are loc cînd toate cele patru nucleotide sînt prezente în concentraţii optime, iar substituirea lor cu nucleotide difosforilate sau cu deoxiribonucleotide duce la sistarea sintezei de RNA de către extracte.

La extractele acelulare trebuie să se adauge pentru a se sintetiza RNA următoarele componente: ATP, UTP, GTP, CTP, $MnCl_2$, spermidinfosfat, enzime, DNA-amorsă, Mg^{2+}; reacţia are loc la *p*H 7,5 în tampon

Tris şi este inhibată de pirofosfat. Dacă extractul acelular este tratat cu deoxiribonuclează înainte de adăugarea componentelor el este activ numai după adăugarea de DNA-amorsă. Compoziţia RNA sintetizat este funcţie de natura (structura) DNA folosit ca amorsă, fapt demonstrat prin utilizarea DNA de diferite provenienţe : DNA fagului T2, DNA din tiroidă, din *E. coli*, din micrococci, din fagul φX 174 (monocatenar şi dubîu catenar) etc. Cantitatea de RNA sintetizată în prezenţa DNA-amorsă poate depăşi de 60 ori concentraţia DNA introdus în mediu. Dacă se folosesc copolimeri sintetici de tipul poli-*d*T sau poli-*d*(A—T) în calitate de amorsă (în locul DNA nativ) atunci se utilizează un singur nucleotid trifosfat, respectiv, ATP şi se formează un hibrid (*d*T) :(*p*A) sau două nucleotide trifosforilate ATP şi UTP şi rezultă un poli-(U—A). Din aceste date experimentale rezultă că DNA-amorsă îndeplineşte nu numai rolul de a amorsa (declanşa) reacţia, dar condiţionează şi succesiunea bazelor azotate în RNA sintetizat. Reacţia globală a acestui proces poate fi redată astfel :



Procesul de transmitere a informaţiei genetice cuprinse în macromolecula de DNA moleculei de *m*RNA poartă denumirea de *transcripţie* şi se realizează enzimatic.

S t e v e n s, W e i s s şi H u r w i t z au izolat în 1960 independent unul de altul şi aproape concomitent *RNA-polimeraza DNA dependentă*, adică enzima capabilă să sintetizeze RNA din ribonucleotid-5′-trifosfaţi, dar numai în prezenţa DNA care serveşte drept tipar în această sinteză, deoarece moleculele de RNA sintetizate sînt complementare ca structură unei catene polinucleotidice a DNA. RNA-polimeraza DNA dependentă necesită prezenţa Mg^{2+}, a celor patru ribonucleozid-5′-trifosfaţi şi sintetizează în prezenţa DNA un RNA ce conţine legături 3′, 5′-fosfodiesterice, adăugînd unităţi mononucleotidice la extremitatea 3′—OH liberă şi determinînd deci creşterea moleculei de RNA în direcţia 5′→ 3′ a catenei polinucleotidice. Această enzimă a fost ulterior identificată în celulele animale, vegetale, microbiene şi este localizată îndeosebi în nucleul acestora dar a fost găsită şi în mitocondrii, unde participă la transcripţia DNA mitocondrial. RNA-polimeraza DNA dependentă izolată din *E. coli* are o masă moleculară de 700 000 şi suferă modificări ale stării de agregare în funcţie de concentraţia ei în soluţie şi de cea a substratului. Pentru transcripţia DNA şi pentru activitatea enzimei sînt necesare două proteine, una denumită *sigma* (σ) care iniţiază catena de RNA, iar cea de a doua proteină (ω) formează legături internucleotidice cu lanţul polinucleotidic în creştere. Se presupune că factorul sigma îndeplineşte un rol important în reglarea transcripţiei.

RNA-polimeraza izolată din *E. coli* este alcătuită din cinci catene polipeptidice $\alpha_2\ \beta\beta'\delta$ cu mase moleculare diferite (41 000 ; 155 000 ; 165 000 și respectiv 86 000) asociate adesea cu o polipeptidă de dimensiuni mici, desemnată prin ω, cu masă moleculară de 12 000. Holoenzima polimerizată, probabil, în prezența ionilor de Zn^{2+} sub forma de $\alpha_2\beta\beta'\delta$ poate disocia în $\alpha_2\beta\beta'$ și factorul δ. Alte polimeraze au o structură mai simplă, de exemplu, cea izolată din *Halobacterium cutirubrum* care este alcătuită din două catene polipeptidice, fiecare cu o masă moleculară de 25 000 sau cea din mitocondriile de *Neurospora* sau din celulele de *E. coli* infestate cu fagul T7 care sînt alcătuite dintr-o singură catenă polipeptidică cu o masă moleculară cuprinsă între 67 000 și 107 000 daltoni.

RNA-polimeraza DNA-dependentă este mai activă în prezența amorsei de DNA dublu catenar decît în cazul DNA monocatenar sau a DNA denaturat. Acțiunea ei este blocată de antibioticul *actinomicina D*, care interacționează cu DNA formînd legături de hidrogen îndeosebi cu resturile de guanină și blocînd, probabil, curbura minoră a DNA și în consecință procesul de transcripție. Proflavina inhibă sinteza RNA cînd se folosesc polimeri de tipul *d*(A—T). Un alt antibiotic *rifamicina* (fig. 20.11) inhibă, de asemenea, procesul de transcripție, deci sinteza de RNA, acționînd însă la nivelul polimerazei.

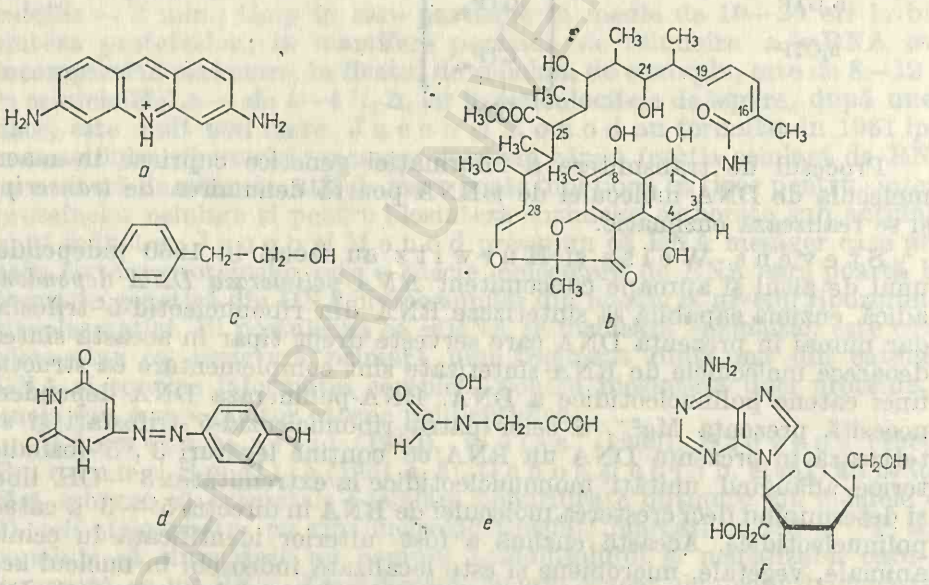


Fig. 20.11. — Structura proflavinei (*a*), rifamicinei (*b*), alcoolului feniletilic (*c*), 6-(p-hidroxifenilazo) uracilului (*d*), inhibitori direcți — și hadacidinei (*e*), psicofuraninei (*f*)-inhibitori indirecți ai biosintezei DNA.

Analiza compoziției în baze purinice și pirimidinice prin metoda frecvenței bazelor vecine a demonstrat că amorsa DNA și produsul sintezei *m*RNA au structuri perfect complementare, iar catena polinucleotidică a *m*RNA are o polaritate inversă celei a catenei corespunzătoare amorsei DNA. În timpul procesului de transcripție între *m*RNA și DNA-amorsă

nu se formează legături de tip covalent. Cînd în calitate de amorsă se foloseşte DNA dublu catenar de la fagul φ X 174 se obţin molecule de *m*RNA care sînt complementare ambelor catene polinucleotidice ale DNA, sugerîndu-se faptul că amîndouă au fost transcrise. Astăzi este aproape unanim acceptată ideea că *in vitro* acest mecanism este real. Dacă se utilizează RNA-polimerază DNA-dependentă purificată din celulele de *E. coli* şi DNA dublu catenar intact, extras tot din *E. coli*, se constată că numai o catenă este transcrisă. Rezultate similare au fost obţinute şi cu bacteriile infestate cu fagii α, *5P8* şi φ X 174 ; bacteriofagii α şi *5P8* au molecule de DNA dublu catenare, dar cele două catene polinucleotidice sînt atît de diferite ca structură şi au densităţi deosebite în CsCl încît pot fi separate prin ultracentrifugare în gradient de CsCl sau separate cromatografic pe o coloană de serumalbumină metilată. *In vitro* ambele catene pot fi transcrise de RNA-polimerază, dar dacă RNA sintetizat *in vivo* este izolat din bacteria infestată cu fag, acest RNA formează molecule hibride (vezi mai jos) numai cu „catenele grele" ale DNA, iar aceşti hibrizi sînt rezistenţi faţă de acţiunea ribonucleazei. O altă dovadă de *transcripţie selectivă* o constituie faptul că în RNA sintetizat de celulele bacteriene infestate cu fag T4 raporturile A/U şi C/G nu sînt egale cu unitatea. Moleculele de DNA monocatenar izolate din fagul φ X 174 nu formează hibrizi cu moleculele de RNA sintetizate *in vivo* şi izolate din celulele bacteriene infestate, ceea ce demonstrează că ultimele nu sînt complementare primelor ; dacă DNA dublu catenar al fagului φ X 174 este denaturat prin încălzire atunci acest RNA obţinut *in vivo* formează hibrizi cu una din catenele polinucleotidice. Probabil, hibridul DNA-RNA se formează nu cu catena polinucleotidică „matură" a DNA din fag, ci cu catena *a doua*, replicativă (Hayashi, Hayashi şi Spiegelman, 1963) (fig. 20.12). *In vitro* sînt transcrise ambele catene polinucleotidice. Această situaţia paradoxală a fost lămurită de Spiegelman care a demonstrat că dacă se lucrează cu DNA replicativ din fagul φ X 174, purificat şi dublu catenar circular, RNA sintetizat este complementar catenei polinucleotidice „mature" cînd DNA amorsă este intact ; cînd DNA amorsă este sub formă monocatenară atunci moleculele de RNA sintetizat sînt complementare ambelor catene ale DNA. Un astfel de mecanism de selecţie este probabil caracteristic pentru macromolecula de DNA dublu catenar circular.

Faptul că în experienţele *in vivo* este utilizată numai o catenă polinucleotidică a DNA în procesul de transcripţie nu este concludent pentru a considera cea de a doua catenă a acestuia neactivă sau de prisos. RNA sintetizat în experienţe *in vitro* în sisteme acelulare de către RNA-polimerază DNA-dependentă, în prezenţă de DNA nativ dublu catenar, stimulează încorporarea aminoacizilor în proteine în timp ce RNA sintetizat de enzimă în prezenţa DNA monocatenar sau a DNA denaturat nu stimulează încorporarea aminoacizilor în proteine, deci este inactiv biologic. Dacă DNA denaturat este renaturat sau DNA monocatenar este trecut sub acţiunea enzimei DNA-polimeraza în formă dublu catenară RNA biosintetizat pe astfel de amorse este biologic activ. Din acest fel de experienţe s-a tras concluzia că biosinteza unui *m*RNA biologic activ necesită o amorsă DNA dublu spiralată. Există dovezi experimentale că DNA conţine puncte de iniţiere specifice de unde începe să acţioneze RNA-polimeraza DNA-depen-

dentă și că aceste puncte sînt semnalate printr-o secvență specifică de baze din DNA, iar primul ribonucleotid sau ribonucleotidul de inițiere este încorporat ca 5′-trifosfat. În celulele de *E. coli* există o singură RNA-polimerază DNA-dependentă care sintetizează trei tipuri de RNA — *m*RNA, *t*RNA și *r*RNA — utilizînd DNA din cromozom. Toate cele trei tipuri de RNA hibridizează cu DNA cromozomial și sinteza lor este inhibată de rifamicină.

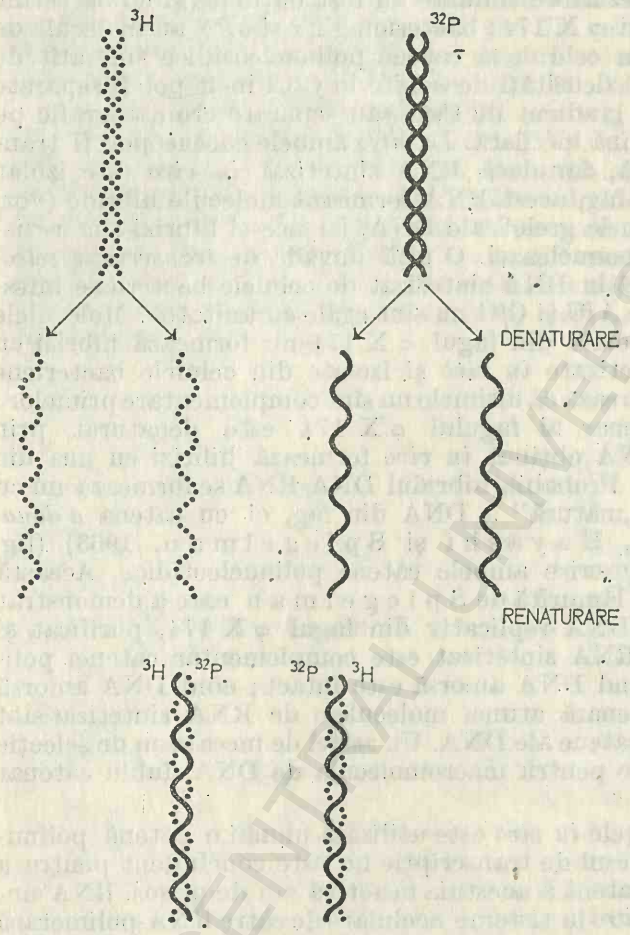


Fig. 20.12. — Demonstrarea procesului de transcripție prin metoda hibridizării DNA și RNA.

Demonstrarea procesului de transcripție a fost realizată prin procedee diferite. Hall și Spiegelman (1961) și Spiegelman (1964) au folosit în acest scop *metoda hibridizării* : pe o amorsă de DNA din bacteriofagul *T2* se sintetizează RNA marcat cu ^{32}P care este separat prin ultracentrifugare în CsCl. La RNA marcat cu ^{32}P se adaugă DNA din fagul *T2* și amestecul se încălzește 10 minute la 100°C, după care se răcește treptat pînă la 40°C și se menține la această temperatură 12 ore, apoi se centrifughează în gradient de CsCl și se obține o singură bandă, ceea ce demonstrează formarea unui hibrid DNA-RNA. Experiența de control se

face la 0°C timp de 12 ore și DNA nu formează hibrizi cu RNA. Dacă la RNA marcat cu ^{32}P, se adaugă după ultracentrifugare DNA izolat dintr-o altă sursă biologică și nu din fagul *T2*, de asemenea, nu se formează hibrizi. Aceste hibridizări conduc la hibrizi rezistenți față de ribonuclează și demonstrează că ambele catene ale DNA, în condițiile experimentale date, funcționează ca matriță pentru sinteza RNA, fie împreună, fie separat, și că RNA sintetizat este complementar ca structură DNA-amorsă sau matrice.

Un alt procedeu este separarea RNA complementar cu ajutorul *cromatografiei pe coloană* alcătuită din DNA fixat pe blocuri mici de celuloză sau de agar-agar. RNA complementar DNA fixat este reținut pe coloană sub formă de hibrizi DNA-RNA în timp ce restul tipurilor sau speciilor moleculare de RNA nu sînt reținute.

Sinteza RNA pe catenele de DNA a fost evidențiată electronomicroscopic în cazul cromozomilor giganți din glandele salivare ale larvelor de *Chironomus*, folosindu-se uridină marcată cu tritiu, precum și cu ajutorul timidinpolinucleotidelor sintetice care pot servi ca matriță pentru sinteza adeninpoliribonucleotidelor, în prezența RNA-polimerazei.

Capacitatea DNA de a servi drept matriță pentru sinteza RNA în procesul transcripției este diminuată considerabil de histone. S-a arătat că metilarea sau acetilarea histonelor care pot interacționa cu DNA cromozomial sînt de natură să înlăture inhibiția RNA *in vivo* și să regleze biosinteza lui în celulă.

20.4.2 Biosinteza RNA ribozomal

Biosinteza acestui acid ribonucleic se realizează printr-o transcripție a unui fragment de DNA, deoarece numai 0,4% din DNA celular are o structură complementară cu RNA din ribozomii 16*S* și 23*S* și poate forma cu acesta hibrizi. Cele două forme de RNA nu concurează între ele pentru aceleași segmente ale moleculei de DNA pentru a forma hibrizi (Yankofski și Spiegelman, 1962, 1963 *a*, *b*).

Studiul vitezei de sinteză a *r*RNA și al numărului de gene care participă la această sinteză în celulele de HeLa a arătat că fiecare genă poate fi transcrisă simultan de către mai multe RNA-polimeraze (Craig, 1974). În experiențele efectuate pe eucariote (ficat de șobolan, timus de bovine, Xenopus sp., ursin de mare ș.a.) s-a demonstrat existența în nucleu a diferitelor clase de RNA-polimeraze DNA-dependente și faptul că sinteza *r*RNA este realizată de o RNA-polimerază *I* sau *A*, care este diferită de RNA-polimerazele nucleoplasmatice prin structura și proprietățile ei fizico-chimice și cinetice.

Cercetările efectuate pe preparate de *r*RNA izolate din diferite surse biologice au arătat că masa moleculară a acestora variază în limite foarte largi: de la molecule mici de *r*RNA izolate de la eucariote (masa moleculară de aprox. $0,7 \times 10^6$ daltoni—18*S*) pînă la *r*RNA vertebratelor inferioare $1,5 - 1,6 \times 10^6$ sau al mamiferelor — $1,7 \times 10^6$ daltoni. Aceste date experimentale (v. și cap. 5) au condus la ideea că moleculele de *r*RNA au o evoluție a dimensiunilor lor și la baza acesteia stă un precursor

inițial de *r*RNA (*r*preRNA) care poate fi identificat după următoarele caracteristici:

— marcarea lui rapidă și omogenă cu izotop radioactiv;
— prezența grupărilor metil în structură;
— localizare nucleolară;
— o mare sensibilitate față de actinomicina *D*. Structura chimică, compoziția în baze azotate, „maturarea" *r*preRNA, locul de metilare, viteza de sinteză și alte aspecte ale biosintezei *r*RNA au făcut obiectul unor ample și interesante cercetări redate analitic în sinteza literaturii realizată de Craig (1974).

20.4.3 Biosinteza tRNA

Biosinteza acidului ribonucleic de transport se produce în nucleu după același mecanism descris mai sus și numai 0,025% din DNA celular conține fragmente complementare ca structură cu *t*RNA (McFarlane, Fraser, 1964; Goodman și Rich, 1962). Procesul de metilare al *t*RNA se efectuează pe catenele polinucleotidice deja sintetizate (Hurwitz și alții, 1964; Svensson și colab., 1963; Srinivasan și Borek, 1963; Gold și Hurvitz, 1963).

În celulele de *E. coli*, la fagul *T4* precum și în celulele mamiferelor biosinteza *t*RNA se realizează dintr-o moleculă precursor a cărei masă moleculară este mai mică de 5*S*, care este instabilă și poate fi detectată numai prin metode speciale (Nishimura, 1974).

20.4.4 Biosinteza RNA-RNA dependent

Extractele obținute din unele microorganisme — *Azobacter vinelandii*, *M. lysodeicticus*, *Escherichia coli* — sînt capabile să sintetizeze RNA în prezența RNA-amorsă nativ sau sintetic, a unui cation bivalent (cel mai eficient fiind Mn^{2+}) și a nucleozidtrifosfaților. În urma experiențelor efectuate de Becker și Jaklik, (1964), Nakamoto și Weiss (1962), August, Ortiz și Hurwitz (1962), Fox și colab. (1964), Krakow și Ochoa (1963), Cline, Eason și Smellie (1963), cu extracte din tumora ascitică Krebs II, pe unele carcinoame ascitice și pe microorganisme infestate cu virusuri care au ca acid nucleic numai RNA s-a demonstrat că RNA sintetizat este direct dependent de cantitatea de RNA amorsă, iar enzima care realizează această sinteză se deosebește de RNA-polimeraza DNA-dependentă printr-o serie de proprietăți fizico-chimice. Noua enzimă a fost denumită *RNA-polimeraza RNA-dependentă*, nu este inactivată de deoxiribonuclează, are o activitate maxină la *p*H 9,5 și este inhibată de ionii Mn^{2+} și de mercaptoetanol, nu este inhibată de actinomincina *D* și este stimulată de prezența în mediul de reacție a ribonucleozid-5'-trifosfaților. Experimentînd pe celule infestate cu virusuri ce conțin RNA, de exemplu cu bacteriofagii *E. coli* —*f2*, *MS2* și *Q* s-a demonstrat că RNA-polimeraza RNA-dependentă sau

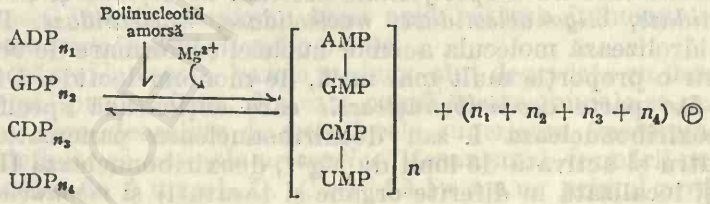
*RNA replicaza** catalizează formarea de RNA din ribonucleozid-5'-trifosfaţi, eliminînd în mediu pirofosfat şi folosind ca matriţă RNA virusului şi nu RNA celulei gazde, ceea ce explică replicarea preferenţială a RNA virusului după infestarea celulelor gazdă. Este probabil ca RNA viral să codifice sinteza unei RNA-replicaze care funcţionează numai cu RNA viral în calitate de matriţă şi este indiferentă faţă de celelalte tipuri de RNA existente în celula gazdei. Studiile realizate pe RNA-replicaza din fagul $Q\beta$ au arătat că aceasta este activă numai în cazul RNA viral intact şi nu poate folosi ca matriţă fragmente de RNA viral. RNA-replicaza virală posedă deci o înaltă specificitate faţă de RNA viral şi nu poate reproduce molecule de RNA virale incomplete sau defective prin folosirea unei matriţe necorespunzătoare.

Sinteza RNA-RNA-dependent a fost intens studiată pe culturi de *E. coli* infestate cu bacteriofagii *f2* şi *MS2* care conţin ca acizi nucleici numai RNA. Cînd virusul infestează celula de *E. coli* catena polinucleotidică (+) a RNA este transcrisă în cadrul procesului de *translaţie* (v. mai jos) pentru a produce RNA-replicaza, enzima care realizează transcripţia RNA viral, deci a catenei (+) pentru a servi ca matriţă pentru producerea catenelor (−) în vederea formării moleculei dublu catenare (+−). Catenele libere (−) sînt apoi generate de moleculele dublu catenare şi servesc drept matriţe pentru sinteza altor catene polinucleotidice (+). Spiegelman şi colab. au arătat că transcripţia se face în direcţia 5'→3' a catenei, iar RNA sintetizat este complementar ca structură şi dimensiuni cu RNA viral-matriceal şi este biologic activ după un număr de aproximativ 15 pasaje succesive.

RNA-Polimeraza-RNA-dependentă a fost identificată în celulele animale, în citoplasma celulelor *L* după infestarea cu *virus Mengo*, în bacterii, plante şi animale infestate cu RNA-virusuri.

20.4.5 Sinteza RNA cu polinucleotidfosforilază

Această sinteză a fost descrisă prima dată de Grünberg-Manago şi Ochoa (1956) şi se realizează din nucleozid-5'-difosfaţi în prezenţa enzimei, a ionilor de Mg^{2+} şi a unui polinucleotid ca amorsă (primer). Polinucleotidfosforilaza catalizează reacţia :



Polinucleotid fosforilaza izolată iniţial din *Azobacter vinelandii* s-a dovedit larg răspîndită la plante şi la microorganisme şi incubată în pre-

* În continuare în text se va folosi acest termen pentru a desemna RNA-polimeraza RNA-dependentă.

zența difosfaților bazelor azotate poate cataliza formarea de polimeri uniformi — poli*A*, poli*C*, poli*U* sau poli*I* — sau copolimeri de tipul poli (*A*, *U*) sau în cazul amestecurilor de ADP, GDP, UDP și CDP copolimeri de felul poli (*A*, *G*, *U*, *C*) în care raporturile molare pot fi 1 : 1 : 1 : 1 sau 1 : 0,5 : 1 : 1 și în care succesiunea bazelor este întîmplătoare.

Amorsa utilizată pentru sinteza polinucleotidelor de către polinucleotid fosforilază trebuie să conțină cel puțin două resturi de nucleozide, dintre care unul trebuie să aibă o grupare hidroxil liberă la $C_{3'}$. Amorsa este încorporată în polinucleotidul sintetizat deoarece această extremitate $C_{3'}$ este folosită pentru formarea unei legături fosfodiesterice și alungirea catenei.

Cu ajutorul enzimei izolate din *A. vinelandii* s-au obținut polimeri sintetici cu mase moleculare cuprinse între 30 000 și 2 000 000, ceea ce înseamnă că echivalează cu masele moleculare de RNA izolat din diferite surse biologice. Mai mult, acești polimeri au spectre de difracție a razelor *X* asemănătoare cu ale RNA-nativ. Este interesant de semnalat faptul că preparatul pur de polinucleotidfosforilază conține 3% nucleotide, sub forma unui oligonucleotid complex, care după opinia lui D a v i d s o n (1968) acționează, probabil, ca o amorsă „montată" inițial în moleculă în vederea asigurării reacției de polimerizare în lipsa unei amorse care se adaugă ulterior. După toate datele experimentale existente este puțin probabil că polinucleotidfosforilaza să funcționeze în celulă și să realizeze sinteză de RNA. Tot D a v i d s o n presupune că această enzimă, probabil, hidrolizează RNA pînă la nucleozid-5'-difosfați, care sînt precursori ai deoxiribonucleotidelor celulare sau reglează nivelul fosfatului anorganic în celulă participînd, probabil, și la hidroliza *m*RNA.

20.5 CATABOLISMUL ACIZILOR NUCLEICI

La nivelul cavității gastrice nucleoproteidele din alimente sînt hidrolizate de enzimele sucului gastric cu formare de proteine și nucleine. Proteina rezultată este degradată în continuare sub acțiunea pepsinei.

Acizii nucleici sînt hidrolizați sub acțiunea sucului pancreatic de următoarele *enzime* care au o *specificitate absolută de acțiune* și de substrat: *polinucleotidaze*, *oligonucleotidaze*, *nucleotidaze*, *nucleozidaze*. Polinucleotidazele hidrolizează molecula acizilor nucleici cu formare de oligonucleotide și, într-o proporție mult mai mică, de mononucleotide. Din această categorie fac parte *deoxiribonucleazele* care acționează specific asupra DNA (deoxiribonucleaza I sau deoxiribonucleaza pancreatică, activă la *p*H neutru și activată de ionii de Mg^{2+}, deoxiribonucleaza II activă la *p*H acid și localizată în diferite organe și țesuturi) și *ribonucleazele* care hidrolizează specific RNA, rupînd legăturile fosfatdiesterice internucleotidice din molecula acestuia.

Oligonucleotidazele *hidrolizează specific oligonucleotidele cu formare de mononucleotide*, care la rîndul lor sînt *hidrolizate de nucleotidaze* specifice cu punere în libertate de *nucleozide și fosfat anorganic.* Nucleozidele sînt scindate hidrolitic de către *nucleozidaze* cu formare de baze azotate și pen-

toză. Chiar bazele azotate rezultate pot fi transformate la nivelul mucoasei intestinale, de exemplu, adenina trece în hipoxantină și în final, în acid uric.

În ceea ce privește absorbția produșilor finali rezultați după hidroliza enzimatică a DNA și RNA se știe că *bazele azotate sînt absorbite sub formă de compuși ușor solubili, mononucleotide și nucleozide*, deoarece bazele azotate sînt substanțe greu solubile și prin urmare nu pot fi absorbite la nivelul mucoasei intestinale. În experiențe efectuate pe animale de laborator și folosindu-se baze purinice și pirimidinice marcate cu izotopi radioactivi s-a demonstrat că numai *adenina alimentară din nucleotide poate servi ca precursor direct pentru biosinteza acizilor nucleici*. Folosindu-se tehnica parabiozei s-a arătat că chiar la nivelul organismului, produsele de degradare enzimatică a RNA și DNA nu sînt refolosite pentru biosinteza acestor macromolecule. Nucleozidele și mononucleotidele provenite din hidroliza nucleoproteidelor alimentare sînt însă transportate pe cale sanguină la țesuturi și utilizate pentru biosinteza acizilor nucleici tisulari.

Metabolismul și rolul acizilor nucleici în organism sînt procese foarte complexe și înțelegerea lor presupune o analiză separată a degradării și biosintezei componentelor acizilor nucleici.

Degradarea bazelor azotate. În organismul animal există numeroase *țesuturi*, dintre care cel mai important este *țesutul hepatic, capabile să hidrolizeze enzimatic acizii nucleici*, datorită prezenței enzimelor specifice acestor acizi reunite sub denumirea de *nucleaze*.

În figura 20.13, *a* sînt redate etapele degradării bazelor purinice de către sistemele enzimatice tisulare. Bazele purinice, adenina și guanina, sînt deaminate de către *adenază* și *guanază*, două enzime care se găsesc într-o concentrație neînsemnată în țesuturi. Din această cauză este probabil ca adenina să fie deaminată cînd se găsește sub formă de nucleozidă, deoarece enzima *adenozin deaminaza* este mult mai răspîndită în țesuturi.

Purinele sînt degradate în organismul mamiferelor superioare (om și maimuțe antropoide) în cursul unui proces de deaminare hidrolitică treptată, urmat de oxidarea produsului rezultat, *xantina* sau *hipoxantina*, cu formare de *acid uric*. Mecanismul și enzimele care participă la degradarea purinelor sînt redate în figurile 20.13, *a* și *b*. La mamiferele inferioare, la păsări și reptile acidul uric rezultat din xantină, trece sub acțiunea *uricazei* în *alantoină*, iar aceasta este transformată în prezența *alantoinazei* în *acid alantoic*. Acest acid tot sub influența unei enzime *alantoicaza* trece în *acid glioxilic* și *uree*.

La păsări și la reptile bazele purinice sînt degradate cu formare de uree ca principal produs final, din care cauză aceste animale se mai numesc și *ureotelice* spre deosebire de mamiferele superioare (maimuța antropoidă și om) definite ca animale *uricotelice*. Mecanismul formării ureei la păsări a fost studiat de Aurel D. Crăifăleanu, primul profesor de biochimie al Universității din București.

Organismul uman produce în decurs de 24 de ore aproximativ 500—600 mg de acid uric. O parte însemnată a acidului uric este eliminată pe cale renală, alta excretată în bilă și de asemenea în fecale. Creșterea și menținerea unei concentrații ridicate a acidului uric în sînge (hiperuricemie) provoacă boala cunoscută sub denumirea de *gută* (acidul uric se depune sub formă de urați la nivelul articulațiilor).

În urina omului normal, supus unei diete carențiale în purine, s-au identificat ca produse ale metabolismului final al acestor baze pe lîngă acidul uric și alți compuși azotați, derivați ai bazelor azotate purinice: 7-metilguanina, 1-metilguanina, xantina, hipoxantina.

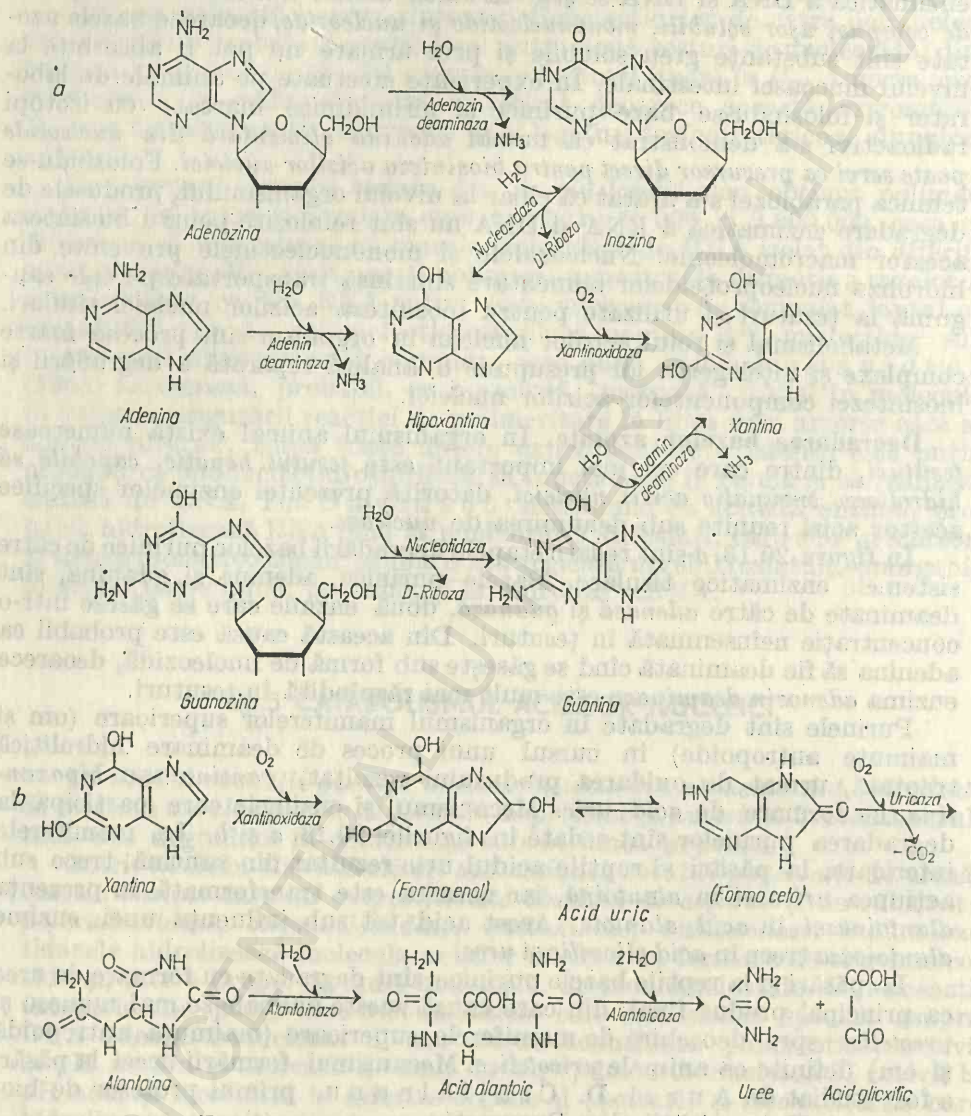


Fig. 20.13. — Degradarea bazelor azotate purinice.

Pirimidinele libere sînt degradate în organism pe cale oxidativă numai la nivelul ficatului cu formare de *uree* și *acid oxalic*. Produsul principal în cazul degradării citozinei și uracilului este β-alanina, iar în cazul degradării timinei — acidul β-aminoizobutiric. În figura 20.14 sînt redate principalele etape ale degradării bazelor pirimidinice. De semnalat faptul

că prin transaminare ambele produse finale ale degradării bazelor pirimidinice sînt transformate în semialdehidă malonică sau semialdehidă metilmalonică.

Catabolismul acizilor nucleici *in vivo* este puţin cunoscut şi există ipoteza că produsele de hidroliză ale RNA şi DNA nu sînt complet degradate fiind parţial reutilizate pentru biosinteza unor noi molecule de polinucleotide (T h o m p s o n, P a u l, D a v i d s o n, 1958). Această ipo-

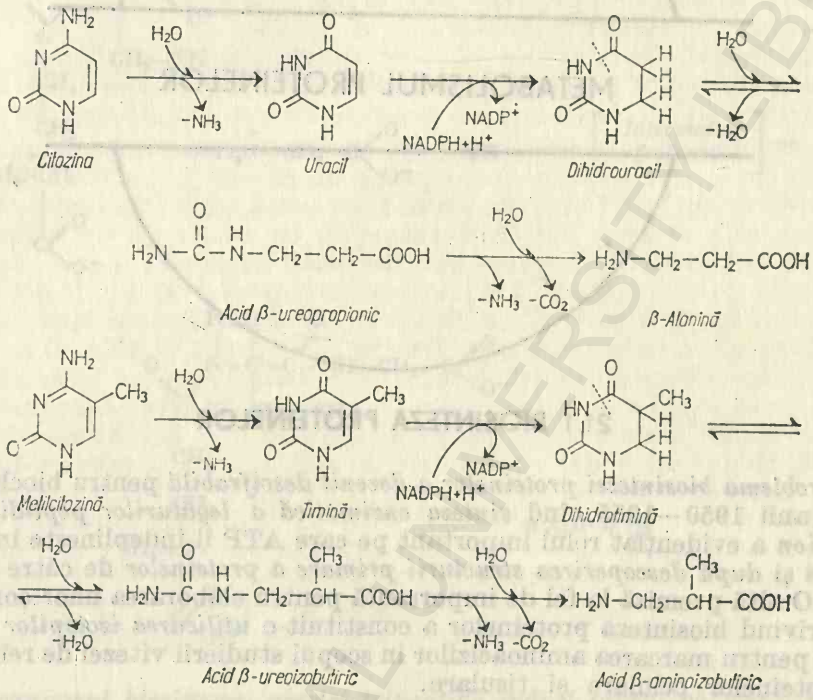


Fig. 20.14. — Degradarea bazelor azotate pirimidinice.

teză este sprijinită şi de alte date experimentale care converg către ideea că *in vivo* DNA nu este hidrolizat sau gradul lui de hidroliză este extrem de limitat, cu toate că celulele normale sau cele în curs de regenerare în cazul ficatului) posedă activităţi deoxiribonucleazice deosebit de mari B r o d y şi a l ţ i i, 1957—1959).

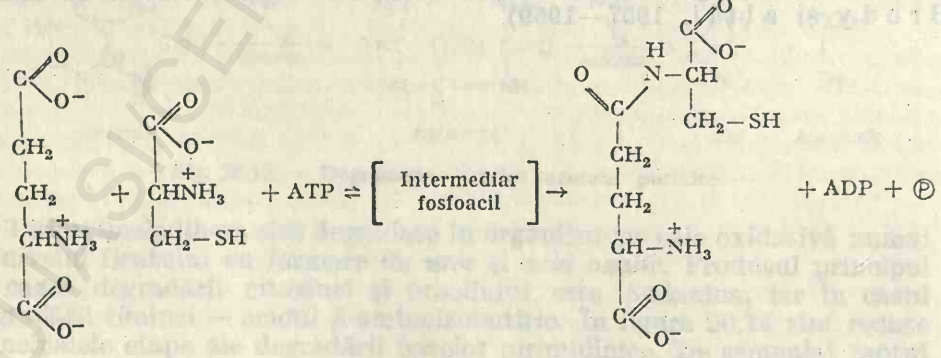
21

METABOLISMUL PROTEINELOR

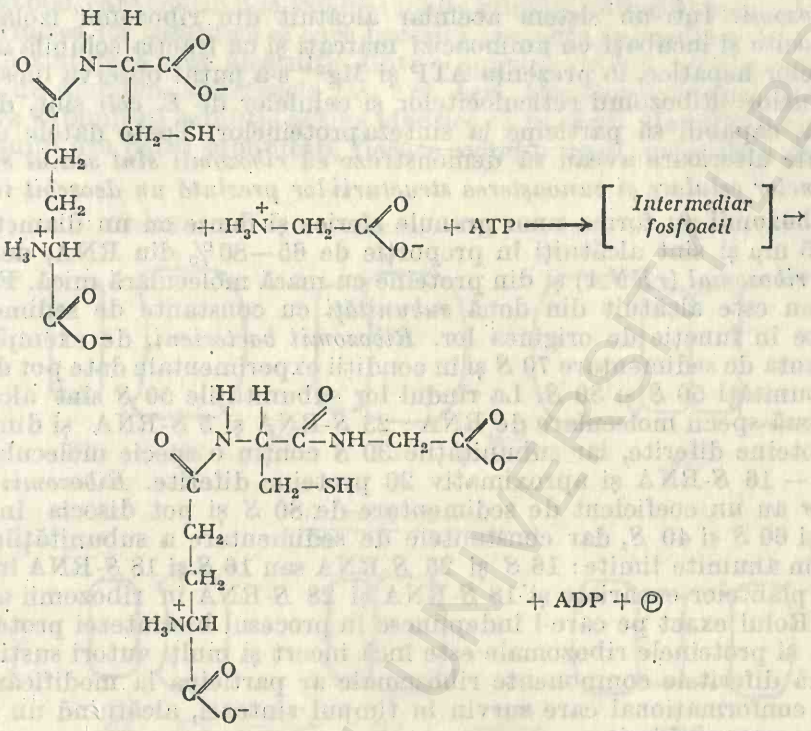
21.1 BIOSINTEZA PROTEINELOR

Problema biosintezei proteinelor a devenit descifrabilă pentru biochimiştii după anii 1950—1955 cînd *sinteza enzimatică a legăturilor peptidice din glutation* a evidenţiat rolul important pe care ATP îl îndeplineşte în acest proces şi *după descoperirea structurii primare a proteinelor* de către S a n g e r. O altă premiză la fel de importantă pentru elaborarea unor concepte noi privind biosinteza proteinelor a constituit-o *utilizarea izotopilor radioactivi* pentru marcarea aminoacizilor în scopul studierii vitezei de reînnoire a proteinelor celulare şi tisulare.

Biosinteza glutationului decurge în organism în două etape distincte. În cursul primei etape glutamatul şi cisteina, în prezenţa ATP şi *γ-L-glutamil-L-cistein-γ-ligazei (ADP)* (EC 6.3.2.3) dau naştere unui compus fosfoacil care ulterior trece în γ-glutamilcisteină, dipeptidă care conţine o legătură peptidică :



Sinteza celei de a doua legături peptidice dintre această dipeptidă și glicocol este realizată de *γ-L-glutamil-L-cistein-glicocol ligaza (ADP)*, deci tot printr-o reacție endergonică și cu formarea unui intermediar fosfoacil:



Mecanismul biosintezei acestei tripeptide indică faptul că *anabolismul și catabolismul unui constituent celular sînt procese care se realizează cu participarea unor enzime diferite,* iar pentru sinteza legăturilor peptidice este absolut necesară prezența ATP ca donor de energie.

Z a m e c n i k și c o l a b. folosind aminoacizii marcați cu izotopi radioactivi și experimentînd pe animale de laborator, pe celule intacte, pe sisteme acelulare și pe fracții celulare separate prin ultracentrifugare diferențială au demonstrat că precursorii biosintezei proteinelor sînt aminoacizii (și nu peptidele cu mase moleculare mici care ulterior se asamblau pentru a forma catene polipeptidice, așa cum se presupunea H a u r o w i t z, 1958). Ei au demonstrat, de asemenea, că perioda de înjumătățire a proteinelor hepatice este de 9 zile, în timp ce a proteinelor musculare este de 120 zile. Dintre fracțiile acelulare, obținute prin centrifugarea omogenatelor hepatice (fracțiile nucleare, microsomale, mitocondriale și fracția solubilă) numai fracția microsomală, în prezența ATP și a substratelor necesare respirației, posedă capacitatea de a încorpora aminoacizii în proteine. Studiile ulterioare au scos în evidență faptul că integritatea celulară nu este absolut necesară pentru sinteza proteinelor și în acest scop sînt necesare trei fracții: fracția microzomală, fracția mitocondrială

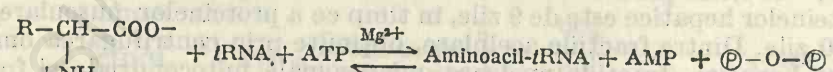
şi fracţia solubilă, fiecare îndeplinind un rol bine precizat. Divizarea în continuare a fracţiei microzomale a evidenţiat prezenţa unor *particule ribonucleoproteice*, identificate în citosol de C l a u d e şi pe suprafaţa reticulului endoplasmatic de P a l a d e şi denumite ulterior de R o b e r t s — *ribozomi*. Într-un sistem acelular alcătuit din ribozomii izolaţi din hepatocite şi incubaţi cu aminoacizi marcaţi şi cu fracţia solubilă a omogenatelor hepatice, în prezenţa ATP şi Mg^{2+} s-a putut observa biosinteza proteinelor. Ribozomii reticulocitelor şi celulelor de *E. coli* sînt, de asemenea, capabili să participe la sinteza proteinelor. Toate datele experimentale ulterioare aveau să demonstreze că *ribozomii sînt sediul sintezei proteinelor celulare şi cunoaşterea structurii lor prezintă un deosebit interes.*

Ribozomii au forma unor granule sferice şi dense cu un diametru de 10—15 mμ şi sînt alcătuiţi în proporţie de 65—80% din RNA, denumit *RNA ribozomal* (*rRNA*) şi din proteine cu masă moleculară mică. Fiecare ribozom este alcătuit din două *subunităţi* cu constante de sedimentare diferite în funcţie de originea lor. *Ribozomii bacterieni*, de exemplu, au constanta de sedimentare 70 *S* şi în condiţii experimentale date pot disocia în subunităţi 50 *S* şi 30 *S*. La rîndul lor subunităţile 50 *S* sînt alcătuite din două specii moleculare de RNA : 23 *S*-RNA şi 5 *S*-RNA şi din peste 30 proteine diferite, iar subunităţile 30 *S* conţin o specie moleculară de RNA — 16 *S*-RNA şi aproximativ 20 proteine diferite. *Ribozomii eucariotelor* au un coeficient de sedimentare de 80 *S* şi pot disocia în subunităţi 60 *S* şi 40 *S*, dar constantele de sedimentare a subunităţilor pot varia în anumite limite: 16 *S* şi 25 *S*-RNA sau 16 *S* şi 18 *S*-RNA în ribozomii plantelor eucariote şi 18 *S*-RNA şi 28 *S*-RNA în ribozomii animalelor. Rolul exact pe care-l îndeplinesc în procesul biosintezei proteinelor *r*RNA şi proteinele ribozomale este încă incert şi mulţi autori susţin ipoteza că diferitele componente ribozomale ar participa la modificările de ordin conformaţional care survin în timpul sintezei, alcătuind un fel de sistem mecanochimic.

Agregarea subunităţilor care alcătuiesc ribozomii este puternic dependentă de concentraţia Mg^{2+} : la concentraţii mici disociază, iar la concentraţii mari se agregă cu formare de dimeri (fig. 21.1 *a*, *b*).

Biosinteza proteinelor necesită prezenţa mai multor factori celulari şi decurge în celulă în mai multe etape succesive.

Etapa de activare enzimatică a aminoacizilor a fost descoperită de Z a m e c n i k şi a l ţ i i care au descris existenţa în fracţia solubilă a omogenatelor hepatice a unui factor termolabil care catalizează o reacţie de activare a aminoacizilor ATP-dependentă. Această reacţie de activare poate fi redată global astfel :



şi este catalizată de enzimele cunoscute sub denumirea de *aminoacil-tRNA sintetaze*, localizate în citoplasma celulelor. Aminoacil-*t*RNA sintetazele sînt enzime cu o înaltă specificitate de acţiune pe care şi-o manifestă atît faţă de aminoacidul activat cît şi faţă de molecula de *t*RNA.

Ele sînt active numai în prezența ATP, pe care în cursul reacției enzimatice îl scindează cu formare de AMP și pirofosfat. Aminoacil-*t*RNA sintetazele au fost obținute în stare pură din diverse surse și îndeosebi din celulele de *E. coli* și s-au dovedit enzime cu mase moleculare cuprinse între 100 000 și 180 000, care conțin una sau mai multe grupări sulfhidril esențiale pentru activitatea lor catalitică și care necesită prezența în mediu a Mg^{2+}. Unele *t*RNA-sintetaze sînt alcătuite dintr-o singură catenă polipeptidică cum sînt, de exemplu, sintetazele *Ile*, *Val*, *Leu*. Alte sintetaze specifice conțin cîteva subunități catalitic active identice ca în cazul Met-*t*RNA-sintetazei alcătuită din patru subunități, fiecare avînd o masă moleculară de 45 000

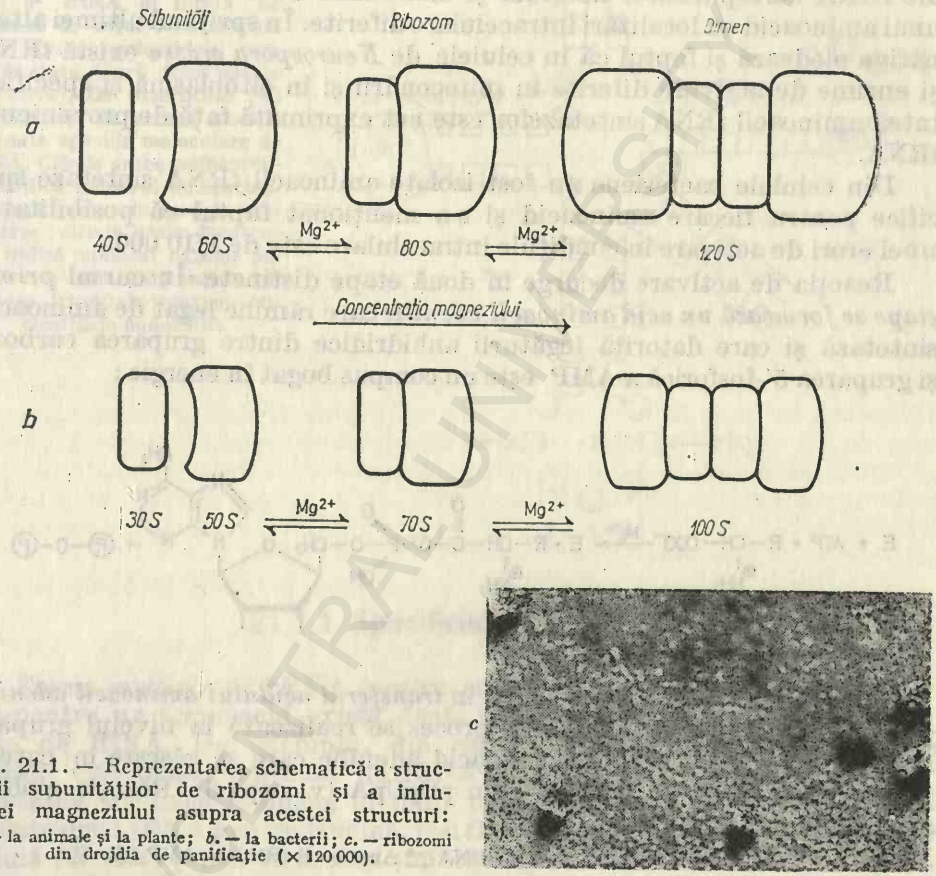


Fig. 21.1. — Reprezentarea schematică a structurii subunităților de ribozomi și a influenței magneziului asupra acestei structuri: *a.* — la animale și la plante; *b.* — la bacterii; *c.* — ribozomi din drojdia de panificație (× 120 000).

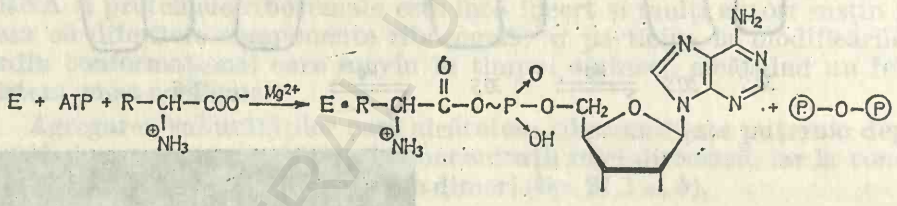
sau al Ser-*t*RNA-sintetazei — formată din două subunități identice fiecare cu o masă moleculară de 45 000. Alte sintetaze au subunități catalitice diferite ca mase moleculare, cum este cazul *Gly*-*t*RNA-sintetazei alcătuită din două subunități de cîte 33 000 daltoni și două subunități cu masă moleculară de 80 000 sau cazul *Trp*-*t*RNA-sintetazei care prezintă o structură de tipul $\alpha_2\beta_2$ fiecare, subunitate avînd însă o masă moleculară de 27 000 daltoni. Aceste enzime trebuie să posede trei situsuri diferite de legare:

unul pentru aminoacid, altul pentru molecula de *t*RNA și al treilea pentru ATP, ceea ce exclude posibilitatea unor erori de activare sau reduce această posibilitate la limita unei probabilități neglijabile.

În trecutul apropiat s-a considerat că pentru fiecare aminoacid în citoplasmă este prezent un *t*RNA specific. Cercetările din ultimii ani au arătat că în celulă pentru fiecare aminoacid există mai mult de un *t*RNA specific (v. mai jos). Formele moleculare multiple de *t*RNA pentru același aminoacid și probabilitatea redusă, de a se comite o eroare de activare pot fi explicate în două feluri: aminoacil sintetaza specifică pentru un aminoacid dat nu este la fel de reactivă pentru formele moleculare multiple ale *t*RNA corespunzător acestuia și moleculele de *t*RNA care corespund unui aminoacid au localizări intracelulare diferite. În sprijinul ultimei alternative pledează și faptul că în celulele de *Neurospora crassa* există *t*RNA și enzime de activare diferite în mitocondrii și în citoplasmă și specificitatea aminoacil *t*RNA sintetazelor este net exprimată față de proveniența *t*RNA.

Din celulele bacteriene au fost izolate aminoacil *t*RNA sintetaze specifice pentru fiecare aminoacid și s-a menționat faptul că posibilitatea unei erori de activare în condițiile intracelulare este de 1/10 000.

Reacția de activare decurge în două etape distincte. În cursul *primei etape se formează un acid aminoacil adenilic* care rămîne legat de aminoacil-sintetază și care datorită legăturii anhidridice dintre gruparea carboxil și gruparea 5′-fosforică a AMP este un compus bogat în energie:



A doua etapă de activare constă în *transferul acidului aminoacil adenilic pe o moleculă de tRNA* și acest proces se realizează la nivelul grupării hidroxil $C_{2'}$ sau $C_{3'}$ a restului de acid adenilic care se găsește în catena polinucleotidică ce se termină prin pCpCpA (v. cap. 5). Reacția globală a celei de a doua etape este:

E-Acid aminoacil adenilic + *t*RNA ⇄ Aminoacil-*t*RNA + AMP + E.

Constanta de echilibru a reacției globale de activare a aminoacidului este de aproximativ 1, iar legătura esterică care ia naștere între restul aminoacidului și *t*RNA este o legătură macroenergică care pune în libertate prin hidroliză aproximativ 7 kcal. Dacă se ia în considerare și faptul că pirofosfatul rezultat în cadrul primei etape de activare este hidrolizat de *pirofosfatază* cu formare de fosfat anorganic atunci se poate considera că reacția de activare a aminoacizilor este *ireversibilă*.

Structura chimică a unui aminoacil-*t*RNA este redată schematic în figura 21.2.

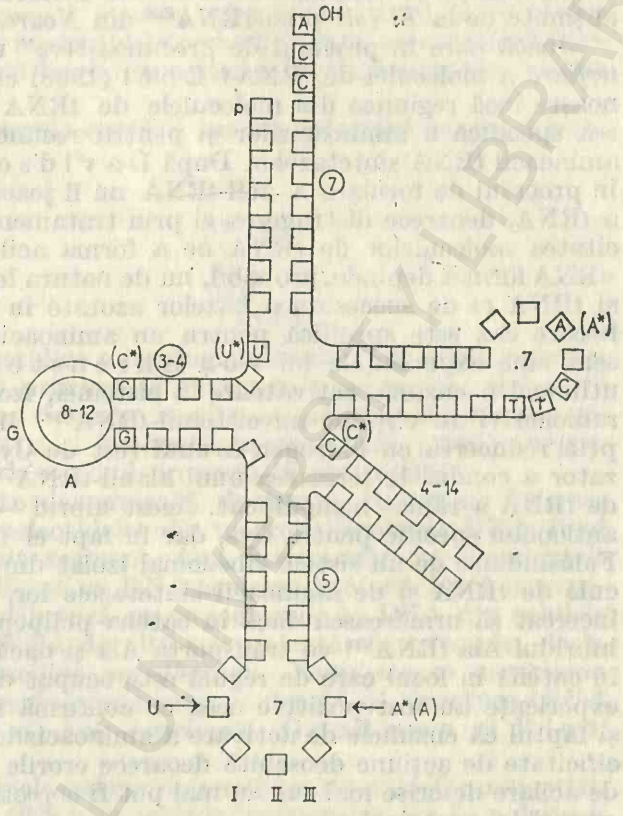


Fig. 21.2. — Structura generală a *t*RNA în formă de „frunză de trifoi". Pe schemă sînt scrise nucleotidele care fie în stare liberă (cele notate cu litere), fie modificate (*) se întîlnesc în aceeași poziție în toate speciile moleculare de RNA. Cifrele arabe neîncercuite indică numărul nucleotidelor în brațele sau buclele respective ; cifrele arabe încercuite indică numărul bazelor pecheî care formează punți de hidrogen, iar cifrele romane — nucleotidele nodoculuî.

21.1.1 Specificitatea *t*RNA

Forme multiple de tRNA pentru același aminoacid. În organismele vii pentru un aminoacid există două, și uneori chiar mai multe, molecule de *t*RNA. De exemplu, din celule de drojdie de bere au fost izolate cîte două molecule de $tRNA^{Thr}$ și $tRNA^{Leu}$ diferite după proprietățile lor fizico-chimice, în timp ce din celulele de *E. coli* au fost izolate două *t*RNA pentru leucină, trei *t*RNA și chiar cinci *t*RNA din aceiași celulă *(E. coli)* și pentru același aminoacid, leucina. (Doctor și alții, 1966; Weisblum, Bentzer, Holley, 1962; von Ehrenstein și Dais, 1963; Apgar și Holley, 1964). Goldstein și alții (1964) au arătat că în aceleași celule de *E. coli* pentru prolină și leucină există trei și, respectiv, patru molecule de *t*RNA.

Barnett și Jacobson (1964) au arătat într-o ingenioasă experiență că mecanismele de acilare enzimatică a *t*RNA sînt destul de complicate, deoarece nu se poate stabili care părți ale acestei molecule participă la procesul de „recunoaștere" a aminoacidului corespunzător.

Acești autori au folosit acil sintetaza extrasă din *Neurospora crassa* și molecule de *t*RNA obținute din celulele de *E. coli* și au observat formarea a trei complexe fenilalanil-*t*RNA: cu moleculele de $tRNA^{Phe}$, $tRNA^{Ala}$ obținute de la *E. coli* și cu $tRNA^{Phe}$ din *Neurospora*.

Joacă oare în procesul de „recunoaștere" un rol important *structura terțiară* a moleculei de *t*RNA? E b e l (1968) este de părere că nu se cunoaște încă regiunea din moleculele de *t*RNA responsabilă pentru fixarea specifică a aminoacizilor și pentru recunoașterea de către *t*RNA a aminoacil *t*RNA sintetazelor. După D a v i d s o n (1968) un rol important în procesul de formare a acil-*t*RNA nu îl joacă nici structura secundară a *t*RNA, deoarece distrugerea ei prin tratamente termice nu scade capacitatea moleculelor de *t*RNA de a forma acil-*t*RNA. Soarta aminoacil-*t*RNA format depinde, probabil, nu de natura legăturilor dintre aminoacid și *t*RNA ci de succesiunea bazelor azotate în molecula acestuia care în fiecare caz este specifică pentru un aminoacid dat. Grăitoare în acest sens sînt experiențele lui v o n E h r e n s t e i n și a l ț i i (1963) care utilizînd o enzimă activatoare a cisteinei, izolată din *E. coli* și izotopi radioactivi au obținut un cisteinil-$tRNA^{Cys}$. Modificarea acestui compus prin reducerea cu hidrogen a unui rest de Cys în prezența unui catalizator a condus la formarea unui alanil-$tRNA^{Cys}$, în care restul moleculei de *t*RNA a rămas nemodificat. Acest hibrid — alanil-$tRNA^{Cys}$ posedă un anticodon specific pentru Cys, dar în fapt el transportă resturi de Ala. Folosindu-se de un sistem ribozomal izolat din reticulocite, de alte molecule de *t*RNA și de aminoacil sintetazele lor, v o n E h r e n s t e i n a încercat să urmărească dacă în catena polipeptidică care se sintetizează hibridul Ala-$tRNA^{Cys}$ va transporta Ala și dacă aceasta va fi încorporată în catenă în locul care de regulă este ocupat de Cys. Rezultatele acestor experiențe au fost pozitive ceea ce confirmă ipoteza lui C r i c k (1958) și faptul că enzimele de activare a aminoacizilor trebuie să posede o specificitate de acțiune deosebită deoarece erorile ce pot surveni în reacțiile de acilare descrise mai sus nu mai pot fi corectate în cursul procesului de sinteză a proteinelor.

Cum se explică marea varietate a moleculelor de tRNA în celulă și procesul biosintezei lor?

G o o d m a n și R i c h (1962) au arătat că în hibridul *t*RNA-DNA numai un procent foarte mic (0,025%) din molecula de DNA participă la formarea hibridului. Se știe că în celulele de *E. coli* macromolecula de DNA are o masă moleculară egală cu $4 \cdot 10^9$ în timp ce *t*RNA din aceeași celulă are masa moleculară de aproximativ 25 000. După unele calcule prealabile *în macromolecula de DNA a microorganismului E. coli trebuie să existe aproximativ 40 de regiuni polinucleotidice cu o secvență complementară tRNA*. Această posibilitate teoretică este în concordanță cu gradul de degenerare a codului, cu existența diferitelor *t*RNA specifice celor peste 20 de aminoacizi și cu constatarea experimentală că pentru un aminoacid este posibilă existența în celulă a două (sau mai multe) molecule de *t*RNA.

Pentru a explica specificitatea de acțiune a *t*RNA C r i c k (1966) a emis *ipoteza corespondenței nesemnificative* („wooble hypothesis"), plecînd de la observația că în codonii tuturor aminoacizilor se întîlnesc toate cele patru baze azotate și în anticodoni pot exista aceleași baze în compozi-

ţia nucleotidelor corespunzătoare. Cea de a treia nucleotidă în codon este variabilă şi nu influenţează sensul codonului. Crick presupune că şi în moleculele de *t*RNA bazele „minore" sau „neobişnuite" pot ocupa în structura anticodonului aceeaşi poziţie, creîndu-se astfel posibilitatea de a forma baze perechi cu nucleotidele codonului fapt care conferă anticodonului o specificitate mai largă, capacitatea de a „recunoaşte" cîţiva codoni diferiţi.

Crick formulează şi *regula cuplării bazelor codonului cu anticodonul în poziţia a treia*

Anticodon	*Codon*
U	A; G
C	G
A	U
G	U;C
I	U; C; A

Analiza structurii nucleotidice a anticodonilor din cele cinci molecule de *t*RNA a căror structură primară se cunoştea în momentul elaborării acestei ipoteze a confirmat-o deoarece inozina ocupă întotdeauna în anticodon poziţia trei, ca dealtfel şi 2-*O*-metilguanina (bază „rară", nepostulată în ipoteza lui Crick ca fiind prezentă în anticodon).

Specificitatea *t*RNA este determinată de faptul că sinteza lui este condiţionată de secvenţa nucleotidelor din macromolecula de DNA, fiind complementară unui anumit segment, fapt demonstrat în experienţele de hibridizare a *t*RNA din *E. coli* cu DNA aceleiaşi bacterii. Dacă în experienţele de hibridizare se utilizează macromolecule de DNA din celulele de *E. coli* şi molecule de *t*RNA de altă provenienţă, de exemplu, de la alte bacterii cum ar fi *Bacillus megatherium, Pseudomonas aeruginosa* etc. nu se constată formarea de hibrizi ceea ce denotă că structura *tRNA posedă o specificitate de specie bine exprimată* (Goodman şi Rich, 1962).

După cum se ştie proteinele native nu conţin resturi de *D*-aminoacizi. Pentru a demonstra rolul *t*RNA în sinteza proteinelor Calendar şi Berg (1967) au obţinut pe cale enzimatică *D*-tirozil-*t*RNA şi au observat încorporarea lui în sisteme acelulare în molecula proteinelor.

Moleculele de *t*RNA sînt localizate în celule nu numai în citoplasmă dar şi în alte formaţiuni celulare. Astfel, de exemplu, în celule de *Neurospora* a fost evidenţiată prezenţa a două „seturi" de aminoacil sintetaze şi de *t*RNA — unul în citoplasmă, iar celălalt în mitocondrii. Această constatare a determinat pe mulţi cercetători să emită ipoteza că unele funcţii de control legate de diferenţierea celulară sînt strîns legate de natura „setului" de *t*RNA care este funcţional.

În concluzie, în prima etapă a biosintezei proteinelor pentru activarea aminoacizilor sînt necesari: moleculele de tRNA, ATP, aminoacil-tRNA-sintetazele, aminoacizii şi ionii de Mg^{2+}.

Etapa de iniţiere a sintezei catenei polipeptidice este cea de a doua fază care necesită *m*RNA, subunităţile ribozomale 30 *S* şi 50 *S*, factorii de iniţiere F_1, F_2, F_3, GTP, Mg^{2+} şi un aminoacil *t*RNA de iniţiere a catenei polipeptidice.

RNA mesager-mRNA — sau informaţional. Succesiunea aminoacizilor în orice moleculă proteică este determinată de ordinea bazelor azotate

într-un fragment (segment) al macromoleculei de DNA, localizat în celula care realizează această sinteză. Modelul structural elaborat de Watson, Crick și Willkins a permis *explicarea diferitelor fapte experimentale acumulate de biochimie și genetică în privința transmiterii caracterelor ereditare.* Moleculele de DNA au însă o masă moleculară mare și nu pot părăsi nucleul celulei. În acest caz *cum se realizează transmiterea informației genetice* înscrise în structura bicatenară a DNA și în succesiunea bazelor azotate în catenele polinucleotidice ale acestuia? Pe de altă parte, DNA are o mare stabilitate chimică și metabolică ceea ce face puțin probabilă participarea lui nemijlocită la biosinteza proteinelor.

S-a demonstrat că *informația genetică înscrisă în DNA din cromozom este transmisă în cursul formării unei catene polinucleotidice de acidul nucleic, care „citește" informația genetică.* În cazul microorganismelor se cunoaște că în cursul procesului de „copiere" a informației genetice cuprinse în molecula de DNA, proces denumit *transcripție*, numai una din cele două catene polinucleotidice este transcrisă în RNA. *În acest caz transcripția este asimetrică și selectivă.* Acest RNA se numește RNA mesager sau *m*RNA și masa lui moleculară depinde de lungimea catenei polipeptidice la a cărei sinteză va participa. De exemplu, *m*RNA din eritroblastele de pasăre are o masă moleculară de 150 000, ceea ce corespunde la aproximativ 500 nucleotide și conține „codul" necesar pentru biosinteza unei catene polipeptidice a hemoglobinei (cea de 146 aminoacizi). Acest *m*RNA este sintetizat din nucleozidtrifosfați sub acțiunea unei RNA polimeraze DNA dependente și după aceea este transferat în citoplasmă prin porii membranei nucleare.

În ultimul timp s-a demonstrat că la bacterii procesul de transcripție depinde de prezența în mediu a tuturor aminoacizilor întîlniți în proteinele microorganismului dat. Dacă un aminoacid lipsește atunci biosinteza *m*RNA este stopată.

Pentru a explica *codificarea aminoacizilor în molecula proteinelor* s-a emis ipoteza că *poziția fiecărui aminoacid este determinată de o „unitate" alcătuită din trei nucleotide care pot da 64 de combinații* ($4^3 = 64$), ceea ce este mai mult decît suficient pentru cei 20 aminoacizi întîlniți de obicei în molecula proteinelor. Crick și colab. (1961, 1962, 1963) au adus dovezi incontestabile în sprijinul *teoriei tripletelor* și au arătat că *segmentul de polinucleotide denumit de ei codon este alcătuit din trei baze.* Datele lor experimentale obținute pe cistronii *A* și *B* ai locusului r_{II} din bacteriofagul T4 au fost confirmate ulterior de numeroși cercetători, printre care și Benzer (1965) care a demonstrat prin descifrarea hărții genetice a fagului T4 că puterea acestui fag de a infesta tulpinile *K* de *E. coli* este funcție de un segment determinat din molecula DNA. Crick și colab. au arătat că *deleția* sau *inserția* de nucleotide în molecula DNA sînt însoțite totdeauna de modificarea succesiunii aminoacizilor în proteinele sintetizate, fapt explicat de ei prin modificarea codonilor, a ordinei în care bazele alternează în ei. Demonstrarea experimentală a *teoriei codonilor* sau *tripletelor* a fost realizată de Staehelin, Wettstein, Oura și Noll (1964), Reichman (1964) și alții care au experimentat pe sisteme sintetizante de HbA sau pe virusul satelit al VMT.

Problema esențială care a devenit actuală după acceptarea teoriei *codonului* a fost *stabilirea tripletelor care codifică fiecare aminoacid* și ea

a fost rezolvată prin folosirea sistemelor acelulare capabile să sintetizeze proteine, izolate din *E. coli* și care conțineau ribozomi, *t*RNA, aminoacil-*t*RNA sintetaza și alte enzime, DNA și *m*RNA (Arnstein, Cox, 1964; Zuckerklandl, 1964; Nirenberg, Matthaei, 1961; Wood și Berg, 1962). Dacă DNA din aceste sisteme acelulare este hidrolizat cu DN-aza sinteza proteinelor încetează după epuizarea din mediu a *m*RNA. Sinteza proteinelor în acest caz poate fi restabilită dacă se adaugă *m*RNA din alte surse biologice (alta decît *E. coli*) sau polinucleotide sintetice obținute *„in vitro"* cu ajutorul *polinucleotidfosforilazei.*

Operațiunea de „spargere" sau descifrare a codului genetic are la bază observația făcută de Nirenberg și Matthaei (1961) că sistemele acelulare care conțin 20 de aminoacizi, în prezența polimerului sintetic poli-*U* sînt capabile să sintetizeze o proteină acidosolubilă care ulterior s-a dovedit a fi alcătuită numai din resturi de Phe. Concluzia logică a acestor experiențe a fost că în *m*RNA codonul fenilalaninei este o tripletă de tipul UUU. Ulterior, Speyer, Lengyel, Basilio, Ochoa (1962), Lengyel și alții (1961, 1962) în laboratoarele conduse de Ochoa au demonstrat că poli-A codifică sinteza unei proteine poli-Lys iar poli-C—poli-Pro, deci AAA codifică Lys, iar CCC-Pro, în timp ce copolimerii nucleotidici, de exemplu poli (A, U) stimulează încorporarea în proteine a Phe, Ile, Leu, Tyr iar poli (U, G) încorporarea Phe, Cys, Val, Gly, Trp. Copolimerul de tipul poli (U, G, C) stimulează încorporarea Arg, dar polimerul poli (U ,G) nu are o asemenea proprietate, de unde s-a tras concluzia că Arg este codificată de codonul UCG. Rezultatul numeroaselor experiențe de acest gen, bazat pe analize statistice privind probabilitatea succesiunii nucleotidelor în polimerii și copolimerii acestora a condus la stabilirea codonilor pentru fiecare aminoacid (Ochoa, 1964) și ulterior la descifrarea completă a codului genetic (tabelul 21.1).* Cititorul poate reconstitui epopeea acestei mari descoperiri, admirînd ingeniozitatea și tenacitatea cercetătorilor, consultînd volumul intitulat *„Reflections on Biochemistry"*, 1977, editată de A. Kornberg în onoarea lui Ochoa.

În structura *m*RNA sînt numai patru tipuri de nucleotide. Dacă se admite că structura de triplet este caracteristică codonului înseamnă că există 64 codoni, ceea ce depășește numărul de aminoacizi codificați în structura proteinelor. Această situație poate fi explicată fie prin faptul că există un număr însemnat de triplete „fără sens" care nu codifică nici un aminoacid, fie prin situația că un aminoacid dat este codificat de mai multe triplete (codoni). Astăzi, este stabilit faptul că exceptînd triptofanul și metionina toți aminoacizii au doi sau mai mulți codoni și că un codon nu poate codifica mai mulți aminoacizi.

Practic, la nivelul tripletei unui codon există posibilitatea apariției unei mutații punctiforme, ceea ce poate avea ca rezultat înlocuirea unui aminoacid cu un altul în structura primară a proteinei sintetizate de către gena astfel modificată. Dacă mutația a survenit la nivelul celei de-a treia nucleotide din structura codonului, de regulă, se constată că structura primară a proteinei este nemodificată. Acest fapt explică de ce în majoritatea cazurilor în care există mai mulți codoni pentru un singur aminoacid aceștia diferă între ei prin natura celei de-a treia nucleotide din triplet. Deci primele două nucleotide din codoni determină specificitatea de recu-

Codul genetic descifrat și confirmat de Nirenberg. Khorana *și* Ochoa*

Prima bază azotată	A doua bază azotată: U	C	A	G	A treia bază azotată
U	UUU, UUC — Phe	UCU, UCC, UCA, UCG — Ser	UAU, UAC — Tyr	UGU, UGC — Cys	U
	UUA, UUG — Leu		UAA Ochre; UAG Amber	UGA, UGG — Trp	C, A, G
C	CUU, CUC, CUA, CUG — Leu	CCU, CCC, CCA, CCG — Pro	CAU, CAC — His; CAA, CAG — Gln	CGU, CGC, CGA, CGG — Arg	U, C, A, G
A	AUU, AUC — Ile	ACU, ACC, ACA, ACG — Thr	AAU, AAC — Asn; AAA, AAG — Lys	AGU, AGC — Ser; AGA, AGG — Arg	U, C, A, G
	AUA, AUG — Met				
G	GUU, GUC, GUA, GUG — Val	GCU, GCC, GCA, GCG — Ala	GAU, GAC — Asp; GAA, GAG — Glu	GGU, GGC, GGA, GGG — Gly	U, C, A, G

* Ochre și Amber-codonii care, probabil, însemnează începutul și finele sintezei catenei polipeptidice.

noaștere și de legare a aminoacil *t*RNA, cea de-a „treia literă de cod" fiind mai puțin importantă. Astfel, leucina este codificată de codonii CUU, CUC, CUA, CUG, iar serina este codificată de UCU, UCC, UCA, UCG etc. Fenomenul prin care același aminoacid este codificat de mai mulți codoni sau triplete poartă denumirea de *degenerare a codului genetic* și poate fi interpretat ca o măsură de stabilizare a genomului față de mutații. Acest fenomen de degenerescență nu este egal exprimat pentru toți aminoacizii : unii aminoacizi au un singur codon *(Met, Trp)* ; unii au doi codoni *(Phe, Lys, His, Tyr, Cys)* ; alții trei *(Ile)*, alții patru *(Val, Pro, Thr, Ala, Gly)* iar pentru unii există șase codoni *(Leu, Ser, Arg)*. Acizii glutamic și aspartic și amidele lor sînt codificate de cîte doi codoni diferiți (v. tabelul 21.1).

S-au putut stabili unele corelații între structura codonilor și structura chimică a aminoacizilor codificați :

— aminoacizii apolari prezintă codoni în structura cărora a doua nucleotidă este U ;

— aminoacizii monoaminodicarboxilici *(Asp* și *Glu)* au primele două litere din cod GA;

— alanina și glicocolul, care diferă printr-o grupare metilen, au codoni deosebiți numai la nivelul celei de-a doua nucleotide.

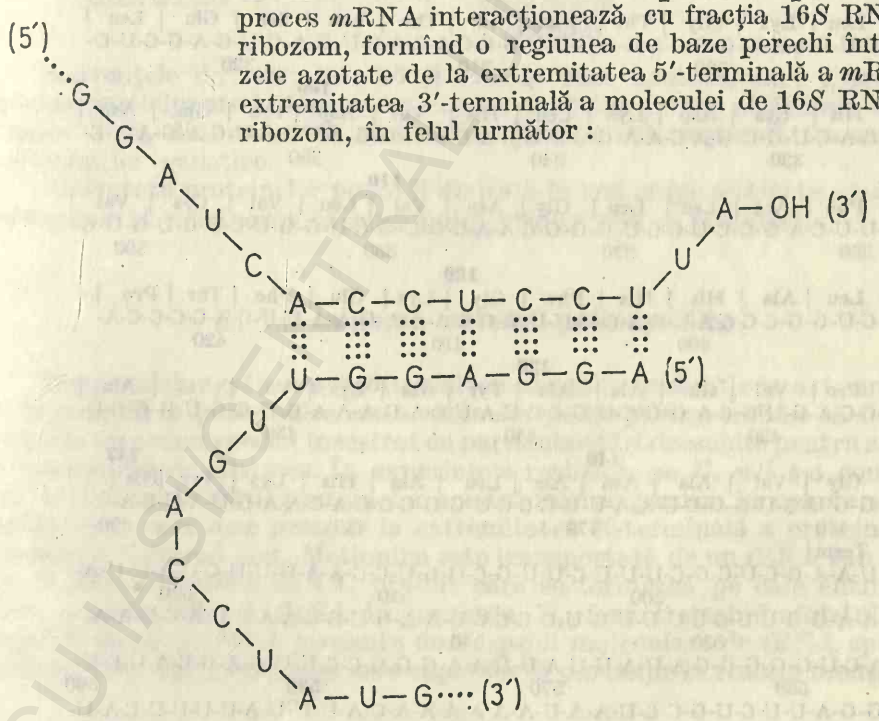
În literatura de specialitate s-a sugerat că la începuturile evoluției biologice „cuvintele codului genetic" erau constituite din două litere (un dublet de nucleotide) și că acestea codificau 15 aminoacizi primordiali, cel de-al treilea nucleotid funcționînd ca o „virgulă". Ulterior, apărînd alți aminoacizi *(Asn, Gln, Met, Tyr, Trp)* a fost absolut necesar ca fiecare aminoacid să fie codificat de un triplet de nucleotide.

Codul genetic este *universal*, adică aceiași codoni codifică aceiași aminoacizi la toate organismele vii (Crick, 1963; Ochoa și Weinstein, 1964; Maxwell, 1962). Un exemplu convingător în acest sens este faptul că sistemul acelular care conține *t*RNA din *E. coli* și ribozomi din reticulocitele de iepure este capabil să sintetizeze hemoglobină (von Ehrenstein și Lipmann, 1961).

În experiențele acelulare „in vitro" au fost obținute numeroase proteine specifice — hemoglobina, β-galactozidaza, toxina difterică, proteina capsidei fagilor, triptofan sintetaza, α-amilaza și altele — care au aruncat o lumină edificatoare asupra mecanismelor biosintezei proteinelor.

Informația genetică conținută din molecula de mRNA este materializată în succesiunea aminoacizilor în molecula proteinelor în cursul unui proces denumit translația informației genetice, care se realizează la nivelul ribozomilor.

În ultimul timp (Brownlee, 1979) s-a demonstrat că în cursul procesului de translație a informației genetice nu sînt folosiți toți codonii din molecula de *m*RNA. Într-o primă etapă a acestui proces *m*RNA interacționează cu fracția 16*S* RNA din ribozom, formînd o regiunea de baze perechi între bazele azotate de la extremitatea 5′-terminală a *m*RNA și extremitatea 3′-terminală a moleculei de 16*S* RNA din ribozom, în felul următor:



extremitatea 5'-terminală a moleculei

-U-G-C-poli(A)
extremitatea 3'-terminală a moleculei

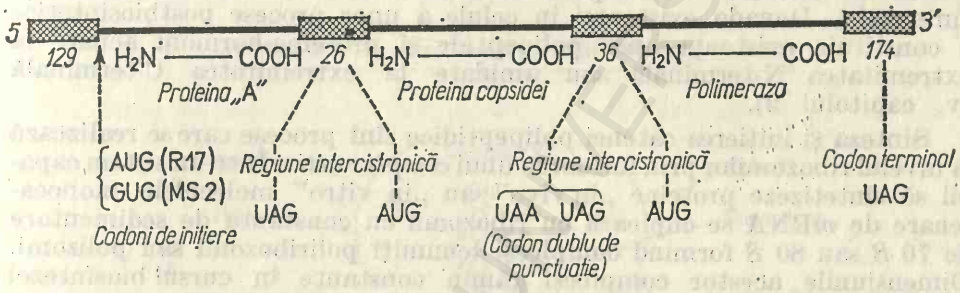
Fig. 21.3. — Structura mRNA care participă la biosinteza β-globinei din eritrocitele de om și codonii aminoacizilor constituienți (după B r o w n l e e, 1979, modificată).

BCU Cluj / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Acest complex a fost izolat experimental în cazul bacteriofagului R17 și are un caracter temporar deoarece imediat după sinteza primei legături peptidice, molecula de *m*RNA trebuie să se „deplaseze" față de ribozom.

În figura 21.3 este redată structura completă a *m*RNA care participă la biosinteza β-globinei din structura hemoglobinei de om. După cum se vede, primele 50 și ultimele 132 de baze azotate nu participă sub formă de triplete la biosinteza proteinelor, formînd secvențe necodificatoare, al căror rol nu se cunoaște. Din această figură reiese dovada de necontestat că *m*RNA este „citit" în direcția 5′—3′, mesajul dat de codoni începînd de la extremitatea 5′-esterificată cu acidul fosforic și are loc spre extremitatea 3′-hidroxil terminală a moleculei. Între secvența de nucleotide a genei și structura primară a catenei polipeptidice există un *raport de colinearitate.*

În cazul bacteriofagilor MS2 și R17 molecula de *m*RNA este utilizată pentru biosinteza mai multor proteine, genele fiind separate între ele prin codoni de inițiere și de punctuație, după schema de mai jos (modificată, după B r o w n l e e, 1979):



Secvențele de 129; 26; 36 și 174 de baze azotate, care „spațiază" genele participante la biosinteza acestor proteine și care alcătuiesc aproximativ 10% din moleculă sînt nefuncționale sub raportul transcripției informației genetice.

Biosinteza proteinelor poate fi divizată în trei etape distincte : *inițierea, alungirea* și *terminarea* catenei polipeptidice sau a proteinei.

21.1.2 Inițierea catenei polipeptidice

Timp îndelungat s-a acreditat ideea că aminoacidul de la extremitatea N-terminală a proteinelor sau a catenelor polipeptidice trebuie să fie codificat de un codon special înzestrat cu particularități deosebite pentru a putea fi recunoscut de ribozom. În experințele realizate pe *E. coli* s-a constatat că sinteza majorității proteinelor acestui microorganism începe cu aminoacidul Met care este prezent la extremitatea N-terminală a proteinei sub formă de N-formil-Met. Metionina este transportată de un *t*RNA sub formă de N-formil-metionil-*t*RNA, produs care se formează pe cale enzimatică prin transformilarea *t*RNA în prezența N_{10}-formiltetrahidrofolatului. În celulele de *E. coli* sînt prezente două specii moleculare de *t*RNA specifice pentru Met, dar numai una este capabilă să participe la reacția menționată

mai sus şi aceasta este denumită metionil-tRNA$_F$ spre deosebire de cea de a doua specie metionil-tRNA$_{Met}$ care nu poate fi formilată în reacţia :

*Met-t*RNA$_F$ + N_{10} — *formiltetrahidrofolat* → *Formil-Met-t*RNA$_F$ + *Tetrahidrofolat*

Enzima care realizează această reacţie de formilare nu este capabilă să formileze Met liberă sau legată de specia moleculară tRNA$_{Met}$ sau tRNA$_M$. Numeroşi cercetători acceptă azi ideea că fMet—tRNA$_F$ este aminoacil tRNA care iniţiază sinteza proteică nu numai la bacterii dar şi în mitocondriile celulelor eucariote. Faptul că la extremitatea N-terminală a numeroaselor proteine nu identificăm N-formil-Met se explică după numeroşi autori prin aceea că restul formilat al acestui aminoacid este hidrolizat postbiosintetic. Formilarea grupării NH_2 a Met are un sens bine determinat : această grupare nu poate participa la formarea unei legături peptidice şi permite legarea f-Met-tRNA$_F$ la situsul peptidil care nu acceptă nici un alt aminoacil-tRNA. În celulele de *E. coli* se sintetizează o proteină care la extremitatea N-terminală are următoarea secvenţă N-formil-Met-Ala-Ser- . . ., dar pentru producerea proteinei finale proteina nou sintetizată poate fi scindată succesiv cu îndepărtarea unuia sau a mai multor resturi de aminoacizi. Dovada existenţei în celule a unor procese postbiosintetice o constituie existenţa unor polipeptide şi proteine-hormoni acilate la extremitatea N-terminală sau amidate la extremitatea C-terminală (v. capitolul 2).

Sinteza şi iniţierea catenei polipeptidice sînt procese care se realizează la nivelul ribozomilor prin formarea unui *complex activ*. Într-un sistem capabil să sintetizeze proteine „in vivo" sau „in vitro" moleculele monocatenare de mRNA se cuplează cu ribozomii cu constanta de sedimentare de 70 *S* sau 80 *S* formînd complecşi denumiţi poliribozomi sau polizomi. Dimensiunile acestor complecşi rămîn constante în cursul biosintezei proteinelor şi depind numai de lungimea matricei de mRNA. Formarea polizomilor a fost observată şi în experienţele „in vitro" cînd ribozomii au fost incubaţi în prezenţa moleculelor de mRNA (sau a unor homo- şi heteropolimeri sintetici) a aminoacil tRNA sintetazelor, ATP, GTP, Mg^{2+}, K^+ şi a enzimelor de transfer corespunzătoare. Într-un asemenea sistem are loc sinteza de polipeptide sau chiar de proteine active.

K a e m f e r a demonstrat că în timpul biosintezei proteinelor în celulele de *E. coli* ribozomii 70 *S* disociază şi se reasociază permanent în subunităţile 50 *S* şi 30 *S*. Cultivînd *E. coli* pe medii ce conţineau ^{13}C, ^{15}N şi ^{2}H K a e m f e r a obţinut celule cu ribozomi „grei". Transferul acestor celule cu ribozomi grei pe medii de cultură obişnuite a condus la apariţia în celule a două specii ribozomale hibride; o specie conţinea subunitatea ribozomală 50 *S* „grea" şi o subunitate „uşoară" 30 *S*, iar cea de a doua specie o subunitate „uşoară" 30 *S* şi o subunitate „grea" 50 *S*, ceea ce demonstrează că în celule *ribozomii 70 S disociază permanent în subunităţi şi reasocierea lor este întîmplătoare*. S-a postulat, de asemenea, că procesele de asociere sînt legate de iniţierea procesului de biosinteză a proteinelor, iar cele de disociere de terminarea sintezei unei catene polipeptidice. Acest postulat a fost verificat cu succes experimental de N o m u r a şi c o l a b. care au arătat că ribozomul 70 *S* disociază cu formarea subunităţilor 50 *S* şi 30 *S* înainte de iniţierea sintezei subunitatea 30 *S* se cuplează cu mRNA şi cu *f*-Met-tRNA$_F$ cu apariţia unui complex

de inițiere, iar acesta la rîndul lui se asociază cu subunitatea 50 *S* pentru a da naștere unui ribozom 70 *S* funcțional. Disocierea ribozomului 70 *S*, formarea complexului de inițiere și reasocierea lui cu subunitatea 50 *S* sînt GTP-dependente. Inițierea biosintezei polipeptidei necesită prezența K^+ și a trei factori proteici specifici notați prin F_1, F_2 și F_3. Acești factori au fost extrași sub formă solubilă cu soluții concentrate de NH_4Cl din subunitatea ribozomală 30 *S*. Toți factorii de inițiere sînt eliberați după formarea ribozomului funcțional și pot fi reutilizați în alte procese similare care au loc în celulă.

Din experiențele lui N i r e n b e r g și M a t t h a e i (1961) privind codul genetic au rezultat următoarele trei concluzii cu caracter general:

— lungimea minimă din matricea oligonucleotidică care mai este încă capabilă să reacționeze cu acil-*t*RNA este egală cu lungimea corespunzătoare a trei baze azotate; de exemplu, trinucleotidele UUU, AAA și CCC pot interacționa cu Phe-*t*RNA, Lys-*t*RNA și Pro-*t*RNA;

— posibilitățile în care sînt înlănțuite bazele azotate în triplete și radicalul fosfat sînt în număr de trei: Ⓟ — A — Ⓟ — A — Ⓟ — A; A — Ⓟ —

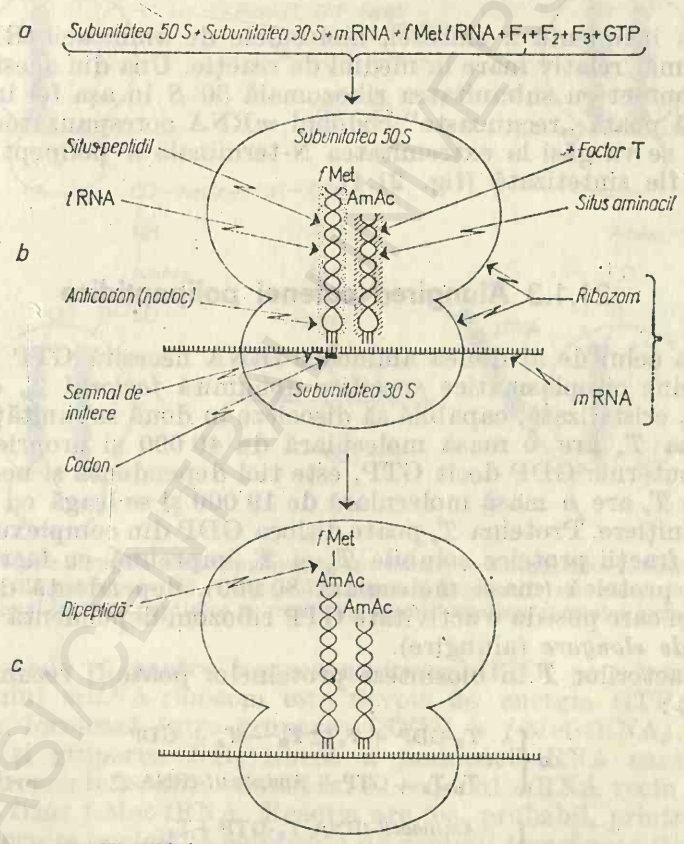


Fig. 21.4. — Inițierea catenei polipeptidice:

a. — factorii necesari acestui proces; *b.* — rolul subunităților ribozomale, al factorilor de inițiere și interrelațiile *t*RNA-*m*RNA la nivelul ribozomului; *c.* — sinteza unei dipeptide.

—A—Ⓟ—A—Ⓟ sau A—Ⓟ—A—Ⓟ—A, în cazul adeninei, de exemplu, ceea ce corespunde cu grupări 3′ (şi 2′)—OH libere (α); gruparea 5′—OH liberă (β) şi ambele grupări OH libere în cele două poziţii (γ). Cea mai eficace înlănţuire a bazelor azotate este α; β este total ineficace, iar (γ) are o eficacitate intermediară. „Citirea" tripletelor de baze azotate se face, probabil, începînd cu extremitatea care are grupare hidroxil liberă în poziţia 5′;

— selecţia tripletei de baze azotate în timpul procesului de translaţie se face cu o mare specificitate şi este în funcţie atît de aşezarea bazelor azotate în tripletă cît şi de baza azotată care se găseşte situată la extremitatea stîngă a tripletei. De exemplu, într-un sistem acelular secvenţa de baze azotate UUG reacţionează numai cu aminoacilul Leu-*t*RNA în timp ce faţă de alţi aminoacizi derivaţi este indiferentă.

În experienţele efectuate cu ajutorul sistemelor acelulare s-a stabilit că fiecărui ribozom dintr-un polizom îi corespunde o singură catenă polipeptidică şi minimum două (maximum trei) molecule de *t*RNA. În timpul sintezei una din cele două molecule de *t*RNA se găseşte în contact, printr-o legătură esterică prin OH din poziţia 2′ sau 3′ a adenozinei, cu catena polipeptidică, în timp ce a doua moleculă de aminoacil-*t*RNA este liberă (fig. 21.4).

În faza incipientă a sintezei, moleculele de aminoacil-*t*RNA se află într-un număr relativ mare în mediul de reacţie. Una din aceste molecule intră în contact cu subunitatea ribozomală 30 *S* în aşa fel încît anticodonul ei să poată „recunoaşte" codonul *m*RNA corespunzător aminoacidului care se va găsi la extremitatea N-terminală a polipeptidei ce urmează să fie sintetizată (fig. 21.4).

21.1.3 Alungirea catenei polipeptidice

Fixarea celui de al doilea aminoacil-*t*RNA necesită GTP şi prezenţa unei proteine citoplasmatice specifice denumită *factorul T*, obţinută în stare pură, cristalizată, capabilă să disocieze în două subunităţi T_u şi T_s.

Proteina T_u are o masă moleculară de 40 000 şi proprietatea de a lega mai puternic GDP decît GTP, este tiol dependentă şi necesită Mg^{2+} în timp ce T_s are o masă moleculară de 19 000 şi se leagă cu T_u în complexul de iniţiere. Proteina T_s poate disloca GDP din complexul T_u-GDP. Cele două fracţii proteice solubile T_u şi T_s împreună cu factorul *G*, tot de natură proteică (masă moleculară 80 000), dependentă de grupările tiol libere şi care posedă o activitate GTP ribozom-dependentă sînt numiţi şi *factori de elongare* (alungire).

Rolul factorilor *T* în biosinteza proteinelor poate fi rezumat în reacţiile (*a*—*c*):

$$a\left\{\begin{array}{l} T_u\text{-GDP} + T_s \rightleftarrows T_u - T_s + \text{GDP} \\ T_u\text{-}T_s + \text{GTP} + \textit{Aminoacil-}t\text{RNA} \rightleftarrows \end{array}\right.$$

$$b\left\{\begin{array}{l} \textit{Aminoacil-}t\text{RNA-}T_u\text{-GTP} + T_s \\ \textit{Aminoacil-}t\text{RNA-}T_u\text{-GTP} \xrightleftharpoons{m\text{RNA} + \textit{Ribozom}} \end{array}\right.$$

$$c\ \{\ \textit{Aminoacil-}t\text{RNA-}m\text{RNA-}\textit{ribozom} + T_u\text{-GDP} + Ⓟ$$

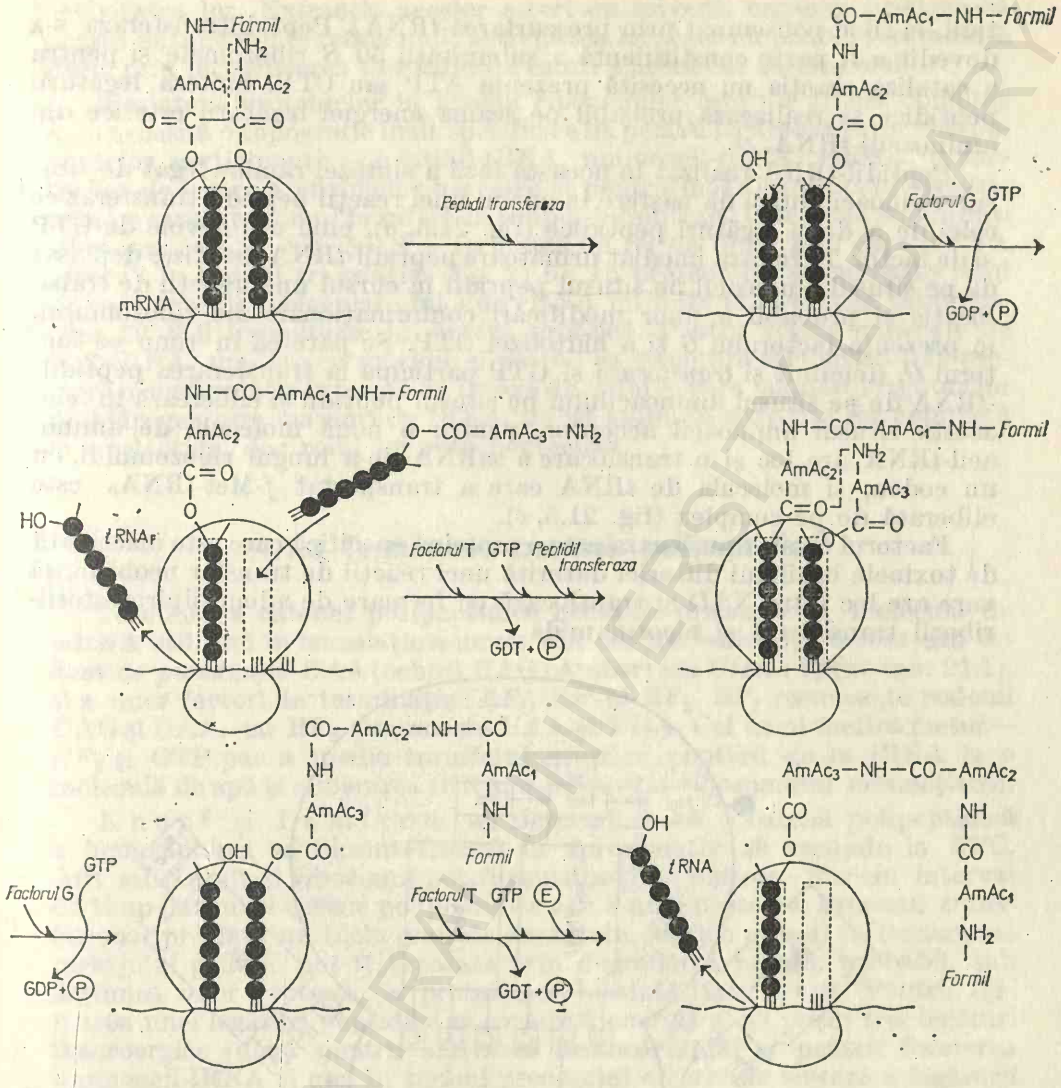


Fig. 21.5. — Etapele alungirii catenei polipeptidice : $AmAc_1$ = aminoacidul 1, $AmAc_2$ — aminoacidul al doilea din catenă etc. (E) — Peptidiltransferaza. După cum se vede ciclul de formare al unei legături peptidice se repetă în condiții similare primului ciclu.

de unde se vede că pentru legarea aminoacil-*t*RNA pe situsul peptidil al complexului *m*RNA-ribozom este nevoie de energia GTP. Legătura peptidică se formează între gruparea COOH a *f*-Met-$tRNA_F$ care este esterificată și gruparea NH_2 liberă a aminoacil-*t*RNA care a format punți de hidrogen între anticodonul lui cu codonul *m*RNA vecin codonului la care este fixat *f*-Met-*t*RNA. Reacția are loc, probabil, printr-un mecanism de dislocuire nucleofilă catalizată de *peptidil transferază* (fig. 21.5, *c*). În etapa următoare cînd se formează cea de a doua legătură peptidică *t*RNA care a transferat *f*-Met este eliberat și rămîne legat de situsul pep-

tidil, el fiind consemnat prin prescurtarea $tRNA_p$. Peptiditransferaza s-a dovedit a fi parte constituientă a subunității 50 *S* ribozomale și pentru a cataliza reacția nu necesită prezența ATP sau CTP. Sinteza legăturii peptidice se realizează probabil pe seama energiei legăturii esterice din aminoacili-*t*RNA.

Peptidil-*t*RNA realizat în această fază a sintezei rămîne legat de situsul aminoacilului și dă naștere în cursul unei reacții peptidil transferazice celei de a doua legături peptidice (fig. 21.5, *a*), cînd are nevoie de GTP și de factor *T*. În faza imediat următoare peptidil-*t*RNA este fizic deplasat de pe situsul aminoacil pe situsul peptidil în cursul unei reacții de translocație și probabil a unor modificări conformaționale ale ribozomului, în prezența factorului *G* și a hidrolizei GTP. Se pare că în timp ce factorul *G*, denumit și *translocază* și GTP participă la transferarea peptidil-*t*RNA de pe situsul aminoacilului pe situsul peptidil și eliberează în felul acesta situsul aminoacil acceptor, pentru o nouă moleculă de aminoacil-*t*RNA are loc și o translocare a *m*RNA de-a lungul ribozomului, cu un codon, și molecula de *t*RNA care a transportat *f*-Met-$tRNA_F$ este eliberată de pe complex (fig. 21.5, *c*).

Factorul *G* sau translocaza este o proteină specifică care este inactivată de toxinele bacilului difteriei datorită unei reacții de transfer neobișnuită care are loc între NAD și translocază cu formare de adenozilpirofosforil-ribozil translocază și nicotinamidă.

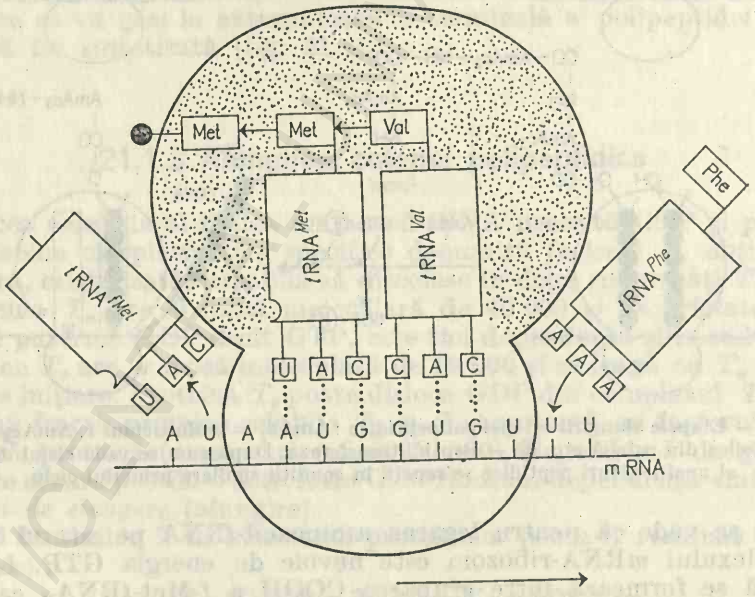


Fig. 21.6. — Vedere simplificată asupra formării legăturilor peptidice și a punților de hidrogen dintre anticodonul *t*RNA și codonul *m*RNA.

Translocaza și aminoacil-*t*RNA sintetazele sînt asociate la mamifere (de exemplu, în ficatul de șobolan, în amigdalele de om) cu esteri ai colesterolului de tipul *colesterol-14-metilhexadecanoat*, care sînt esențiali pentru

activitatea lor. Extracţia acestor esteri cu solvenţi organici inactivează aceste enzime sau le reduc mult activitatea lor, care nu poate fi restabilită decît prin introducerea în mediu de esteri sintetici ai colesterolului.

Biosinteza proteinelor la nivelul ribozomilor este un proces complex care necesită o topografie înalt specifică atît pentru legarea tuturor componentelor participante — peptidil-*t*RNA, aminoacil-*t*RNA, *m*RNA, a factorilor de legare a enzimelor necesare şi pentru modificările conformaţionale pe care ribozomul le suferă în timpul biosintezei. Cele două subunităţi ribozomale — 30 *S* şi 50 *S* — formează un fel de tunel prin care *m*RNA „trece" în timpul translaţiei (fig. 21.6). În prezent nu se cunoaşte rolul pe care speciile moleculare mici de *r*RNA întîlnite în structura subunităţilor 50 *S* îl îndeplinesc în sinteza proteică. Pentru aceste molecule de 5 *S* *r*RNA, similare ca mărime şi posibil ca structură secundară (ele prezintă o conformaţie în formă de frunză de trifoi în care numărul legăturilor de hidrogen este maxim) cu *t*RNA, a fost stabilită secvenţa lor completă în nucleotide, dar rolul lor este neprecizat.

21.1.4 Terminarea catenei polipeptidice

Terminarea catenei polipeptidice necesită prezenţa în molecula de *m*RNA utilizată în translaţie a unuia din cei trei *codoni fără sens* sau *codoni de punctuaţie* UAA (ochre) UAG (Amber) sau UGA (?) (v. tab. 21.1). şi a unor factori de terminaţie : RF_1, RF_2 şi RF_3. RF_1 recunoaşte codonii UAG şi UAA, iar RF_2 recunoaşte UAA şi UGA. Cel de-al treilea factor — RF_3 şi GTP par a media transferul grupării peptidil de la *t*RNA la o moleculă de apă şi eliberarea *t*RNA, *m*RNA şi a ribozomului nefuncţional.

K n o p f şi L a m f r o m au determinat că o catenă polipeptidică a hemoglobinei se biosintetizează în aproximativ 20 secunde la 37°C. Atît *m*RNA cît şi ribozomii pot fi reutilizaţi în sinteza, într-un interval de timp dat, unei catene polipeptidice sau a unei proteine. Procesul translaţional prezintă un înalt grad de acurateţe. Rarele greşeli în traducerea mesajului genetic pot fi reparate prin degradarea rapidă, probabil, sub acţiunea unor proteaze, a proteinelor biosintetizate greşit. Pentru formarea unei legături peptidice se consumă energia a cel puţin trei legături macroergice (două pentru activarea aminoacidului şi pentru formarea aminoacil-*t*RNA şi una în timpul procesului efectiv de sinteză a legăturii —CO—NH—), adică $7 \times 3 = 21$ kcal. Energia liberă standard de hidroliză a unei legături peptidice este de circa — 5 kcal, deci variaţia energiei libere de formare a legăturii peptidice este de $21 - 5 = 16$ kcal, ceea ce indică un proces exergonic şi ireversibil. Degajarea unei cantităţi atît de mari de energie poate fi interpretată ca o măsură pentru acurateţea transcrierii mesajului genetic înglobat în structura *m*RNA la nivelul catenei polipeptidice nou sintetizate.

Există puţine informaţii asupra stării conformaţionale a proteinei nou sintetizate. Nu este cunoscut cu precizie dacă plierea catenei polipeptidice are loc după ce biosinteza a fost terminată şi structura a fost detaşată de pe ribozomi sau dacă plierea are loc simultan cu creşterea catenei. O serie de date experimentale pledează pentru ultima alternativă.

Astfel, ribozomii izolați manifestă o serie de activități enzimatice diferite de cele implicate direct în procesul de biosinteză, care pot fi datorate diverselor enzime a căror biosinteză este aproape terminată. Activitățile catalitice n-ar putea să fie manifeste dacă structura n-ar fi pliată pentru constituirea tridimensională a centrului catalitic activ.

Factorul de eliberare sau factorul R a fost separat și s-a dovedit a fi alcătuit din două proteine acide : una cu o masă moleculară de 44 000 și eficace în cazul codonilor UAA și UAG factorul R_1 și alta — factorul R_2, cu masă moleculară de 47 000 activ în cazul codonilor UAA și UGA. Viteza de acțiune a factorului *R* este accelerată sau stimulată de un factor *S* care micșorează K_m factorilor R_1 și R_2 pentru codonii de punctuație. De menționat faptul că subunitățile ribozomale sînt incapabile să lege factorul de eliberare *R* și numai ribozomii 70 *S* pot realiza acest lucru în prezența trinucleotidelor și ionilor Mg^{2+}. Factorul de eliberare *R* este inactivat de reactivii pentru grupările SH, de N-etilmaleimidă și de tripsină.

Reacția de eliberare a catenei polipeptidice de pe ribozom pare a necesita prezența peptiditransferazei și este stimulată de etanol. Despre starea în care catena polipeptidică părăsește ribozomul se știu relativ puține fapte exacte. Lehninger (1975) presupune că molecula nou sintetizată prezintă o conformație nativă, deoarece ribozomii izolați arată o mare varietate de activități enzimatice, ceea ce denotă, după opinia lui, că proteinele cu activitate enzimatică sînt active imediat după terminarea sintezei lor pe ribozom. În nici un caz nu trebuie să excludem posibilitatea unor modificări postbiosintetice ale catenelor și moleculelor proteice, deoarece formarea punților disulfurice specifice unor proteine active (enzime, hormoni) necesită de cele mai multe ori prezența unor enzime specifice, de exemplu, insulina redusă trece în stare activă numai în prezența *glutation-insulin transhidrogenazei*.

21.1.5 Inhibitorii sintezei proteinelor

Sinteza proteinelor poate fi blocată de diferiți inhibitori : *puromicina, ciclohexamida, actinomicina D* (fig. 21.7), *cloramfenicol, streptomicina, rifampicina, rifamicina, aureomicina* și *terramicina*.

Actinomicina D blochează sinteza proteică la nivelul procesului de transcripție complexînd resturile de guanină din DNA și dînd naștere unui complex DNA-actinomicină *D* care împiedică sinteza de *m*RNA prin blocarea RNA-polimerazei-DNA dependente.

Rifampicina este, de asemenea, un inhibitor specific al RNA-polimerazei DNA dependentă. Ea nu are nici o acțiune asupra polimerazei DNA și direct nici asupra biosintezei proteinelor.

Puromicina care are o structură similară cu restul nucleotidic AMP din aminoacil-*t*RNA întrerupe alungirea catenei polipeptidice prin capacitatea ei de a substitui aminoacil-*t*RNA și formînd o peptidilpuromicină face imposibilă sinteza unei noi legături peptidice, deoarece gruparea ei carboxil este prezentă sub formă amidică și nu poate fi atacată. *Peptidil-puromicina* se detașează de pe ribozom în stadiul cînd masa ei moleculară este mică. Elucidarea modului de acțiune a puromicinei a demonstrat

încă odată că alungirea catenei polipeptidice se face prin adăugarea aminoacil-*t*RNA la extremitatea C-terminală a polipeptidei.

Cloramfenicolul inhibă sinteza proteică în cazul ribozomilor 70 *S* ai celulelor procariote și ai mitocondriilor de la eucariote, dar este inactiv în cazul ribozomilor 80 *S* ai celulelor eucariotelor. El intervine în etapa de formare a peptidelor și blochează ribozomii la fel ca și tetraciclinele *terramicina* și *aureomicina*, prevenind legarea normală a *m*RNA pe ribozomi. *Cicloheximida* denumită și *actidiona* inhibă sinteza proteică în cazul ribozomilor 80 *S* din celulele eucariotelor, dar este ineficace în cazul ribozomilor 70 *S* ai procariotelor.

Streptomicina are un mecanism de acțiune particular : ea leagă subunitatea 30 *S* a ribozomilor și determină atît inhibiția sintezei proteice cît și citirea greșită a codului genetic. Se presupune că prin legarea subunității 30 *S* streptomicina modifică conformațional ribozomul și aminoacil-*t*RNA nu pot interacționa corect prin anticodonii lor cu codonii din *m*RNA.

Sinteza proteinelor poate fi inhibată și prin blocarea formării aminoacil-*t*RNA datorită blocării specifice a aminoacil-*t* RNA sintetazelor corespunzătoare. De exemplu, 5-metil-triptofanul inhibă formarea Trp-*t*RNA și deci biosinteza proteinelor care conțin în molecula lor resturi de Trp.

21.1.6 Alte aspecte ale biosintezei proteinelor

Izolarea atentă, în condiții menajate, a ribozomilor eucariotelor a condus la observația că ei se găsesc în celulă în mănunchiuri alcătuite din 3—4 pînă la 100 ribozomi. Aceste formațiuni au fost denumite *ergozomi*, *polizomi* sau *poliribozomi* și sînt menținute de o moleculă comună de RNA. Aceste observații au condus la concluzia că mai mulți ribozomi „transcriu" aceeași moleculă de *m*RNA simultan.

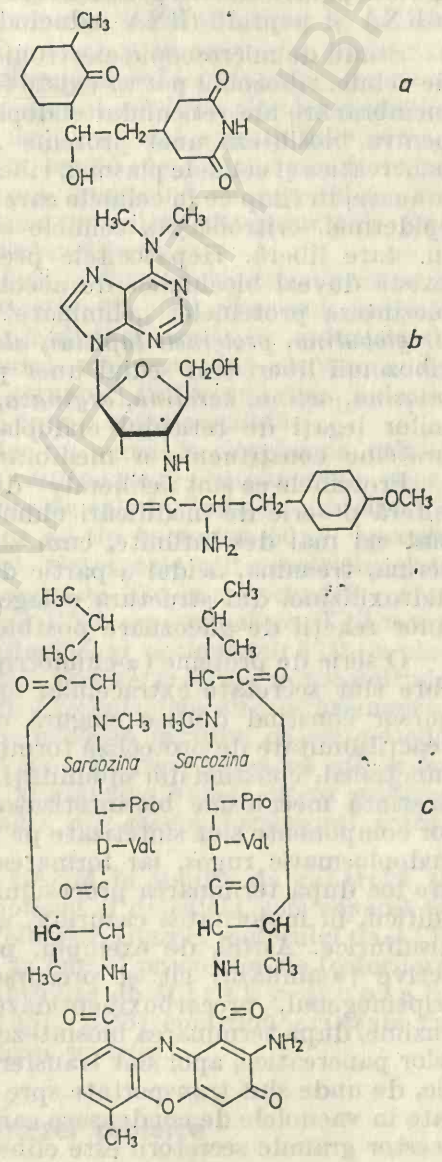


Fig. 21.7. — Exemple de inhibitori ai sintezei proteinelor :
a. — cicloheximida ; *b.* — puromicina ; *c.* — actinomicina *D*.

Astfel este mărită eficiența unei singure macromolecule de *m*RNA de a funcționa ca tipar.

Concentrațiile ionice la care ribozomii funcționează par a fi 10—200 mM KCl și 1—10 mM $CaCl_2$. Prin creșterea concentrației de KCl peste 500 mM sau prin scăderea concentrației de $MgCl_2$ sub 1 mM are loc disocierea ribozomilor în subunitățile componente. Un ribozom programat pentru sinteza proteică este mai stabil decît un ribozom nefuncțional, *m*RNA și peptidil-*t*RNA inducînd efecte stabilizatoare.

Studii de microscopie electronică au indicat faptul că în diferite tipuri de celule, ribozomii pot să existe fie în stare liberă, fie legați de sistemele membranare ale reticulului endoplasmatic. Astfel, în celulele specializate pentru biosinteza unor proteine „eliminate", cum sînt celulele acinare pancreatice și celulele plasmei, ribozomii sînt legați pe aceste sisteme membranare, în timp ce în celulele care rețin proteinele noi sintetizate (celulele epidermei, eritroblaștii, celulele embrionare) conțin în special ribozomi în stare liberă. Hepatocitele prezintă o situație intermediară. Astăzi, există dovezi biochimice de necontestat că ribozomii legați participă la biosinteza proteinelor „eliminate" ulterior din celulă *(imunoglobulinele, tiroglobulina, proteinele laptelui, ale plasmei, albumina serică)*, în timp ce ribozomii liberi sînt sediul unor proteine ce rămîn în celulă *(globina, miozina, actina, keratina, arginaza, catalaza* etc.). În plus, funcția ribozomilor legați de reticulul endoplasmatic poate explica biosinteza unor proteine constituente a membranelor intracelulare.

Proteinele ce sînt „eliberate" din celulă, după ce au fost biosintetizate, suferă o serie de modificări chimice, dintre care reacțiile de glicozilare sînt cel mai des întîlnite, cum sînt, de exemplu, resturile aminoacizilor serina, treonina, acidul aspartic din structura imunoglobulinelor sau ale hidroxilizinei din structura colagenului, care sînt transformate în cursul unor reacții de glicozilare postbiosintetice.

O serie de proteine (α-chimotripsinogenul, pepsinogenul, procolagenul) care sînt secretate extracelular sînt biosintetizate sub forma unui precursor constînd dintr-o singură catenă polipeptidică, care apoi suferă reacții limitate de proteoliză formînd proteine active din punct de vedere funcțional, constînd din subunități. Alte proteine cu structură cuaternară prezintă mecanisme biosintetizatoare diferite, în sensul că subunitățile lor componente sînt sintetizate pe poliribozomi diferiți atașați la reticulul endoplasmatic rugos, iar formarea edificiului oligomer, activ funcțional, are loc după terminarea procesului de alungire a catenelor polipeptidice, edificii, în majoritatea cazurilor, stabilizate prin constituirea de legături disulfurice. Astfel, de exemplu, pancreasul exocrin secretă atît enzime active (α-amilaza) cît și precursori enzimatici (α-chimotripsinogenul, tripsinogenul, procarboxipeptidazele). P a l a d e a stabilit că aceste enzime, după terminarea biosintezei lor, se găsesc legate de ribozomii celulelor pancreatice, apoi sînt transferate în lumenul reticulului endoplasmatic, de unde sînt transportate spre veziculele aparatului G o l g i, acumulate în vacuolele de condensare care devin *granule de zimogen*. Conținutul acestor granule secretorii este eliberat în exteriorul celulei prin *exocitoză*, proces dependent de respirație. Veziculele rămase după eliberarea conținutului lor sînt fie degradate, fie reutilizate pentru înmagazinarea unor noi enzime pancreatice.

Lactozo sintetaza, enzimă care catalizează reacţia :

$$\text{UDP-}D\text{-}Galactoza + D\text{-}Glucoza \xrightarrow{Mg^{2+}} Lactoza + \text{UDP}$$

ce reprezintă principalul proces din glanda mamară, în lactaţie, este constituită de fapt din două proteine : *α-lactalbumina* şi *galactozil-transferaza*. Galactozil-transferaza catalizează, de fapt, o reacţie de transfer a galactozei de la UDP-galactoză la N-acetil-glucozamină, fiind implicată în legarea galactozei la diferite proteine. Prezenţa α-lactalbuminei în glanda mamară modifică specificitatea acestei enzime şi în acest caz particular utilizează glucoza ca acceptor. α-Lactalbumina este sintetizată pe ribozomii legaţi la reticulul endoplasmatic rugos ai celulelor glandei mamare, transportată prin canalele reticulului, iar la nivelul aparatului G o l g i interacţionează cu galactozil-transferaza legată de membrană, formînd lactozosintetaza, al cărei produs — lactoza, împreună cu α-lactalbumina este secretat în lapte. Deci α-lactalbumina reprezintă atît principala proteină a laptelui cît şi un mediator al sintezei lactozei.

În cazul catenelor polipeptidice ale hemoglobinei şi miozinei polizomii sînt alcătuiţi din 5—6 ribozomi şi respectiv 60—100 ribozomi, spaţiaţi între ei, de-a lungul moleculei de *m*RNA la distanţe egale cu aproximativ 30 Å. Cercetarea polizomilor cu ajutorul microscopului electronic de înaltă rezoluţie a arătat că aceştia au structuri tridimensionale, helicoidale şi în interiorul celulei sînt aşezaţi într-o reţea regulată.

Sinteza proteinelor la eucariote are loc nu numai în citoplasma celulei dar şi în mitocondrii care s-au dovedit a conţine toate componentele necesare acestui proces, dar care sînt distincte de cele întîlnite în citoplasmă. De exemplu, ribozomii mitocondriali sînt de tip bacterian 50 *S*, speciile moleculare de *t*RNA şi aminoacil-*t*RNA sintetazele mitocondriale sînt, de asemenea, diferite de cele extramitocondriale. Tot în mitocondrii a fost identificate un DNA specific, circular şi *m*RNA corespunzător. Utilizarea inhibitorilor sintezei proteice — cloramfenicol şi actinomicină *D*—a demonstrat existenţa în mitocondrii a unei sinteze proteice mitocondriale specifice şi similare celei de la bacterii. Cloroplastele au, de asemenea, capacitatea de a sintetiza unele proteine datorită faptului că ele posedă DNA. Majoritatea cercetătorilor înclină să acrediteze ideea că *atît mitocondriile cît şi cloroplastele pot codifica şi sintetiza numai cîteva proteine care se întîlnesc în proteinele membranare ale acestor formaţiuni intracelulare.*

Nucleul celulelor izolate din glanda tiroidă în soluţie de zaharoză şi în prezenţa unor concentraţii mici de potasiu şi de calciu *este capabil să sintetizeze proteine.* Sinteza proteinelor foloseşte energia moleculei de ATP care este sintetizat în nucleu, probabil, în cursul proceselor de fosforilare anaerobă. Aceste date experimentale obţinute de M i r s k y şi c o l a b. (1956) şi de A l l f r e y şi a l ţ i i (1957, 1963) confirmă *existenţa în nucleu a tuturor factorilor necesari sintezei proteice.*

21.1.7 Controlul sintezei proteice

Faptul că celula sintetizează proteinele şi enzimele celulare în cantităţi limitate, corespunzătoare stării ei funcţionale sugerează ideea existenţei unor *factori de reglare* sau a unui *control genetic*. Majoritatea datelor

experimentale de care dispun în prezent biochimia şi genetica sînt rezultat al experienţelor efectuate pe microorganisme şi numai unele date experimentale reduse ca număr indică faptul că la vertebrate şi în special la mamifere întîlnim mecanisme sau factori similari celor care acţionează la bacterii.

Majoritatea cercetătorilor sînt de acord cu opinia că cea mai mare parte a macromoleculei de DNA în condiţii obişnuite, normale, este „blocată", nelucrativă, nefuncţională şi că mecanismul reglării sintezei enzimelor la bacterii, descris de Jacob şi Monod (1961, 1962, 1963) şi confirmat ulterior de Stent (1964), Ames şi Martin (1964) şi de alţi numeroşi cercetători reprezintă un model al controlului şi reglării biosintezei proteice în celulă.

După opinia lui Jacob şi Monod cîteva *gene structurale* sau *cistroni*, aşezate una în vecinătatea celeilalte în molecula de DNA formează o *unitate funcţională* denumită *operon*, care la rîndul lui se găseşte situat lîngă o *genă operator* (fig. 21.8). Cînd gena operator este liberă, deci funcţională, toate genele structurale sau cistronii sintetizează molecule de *m*RNA, care conţin informaţia genetică cuprinsă în gena structurală

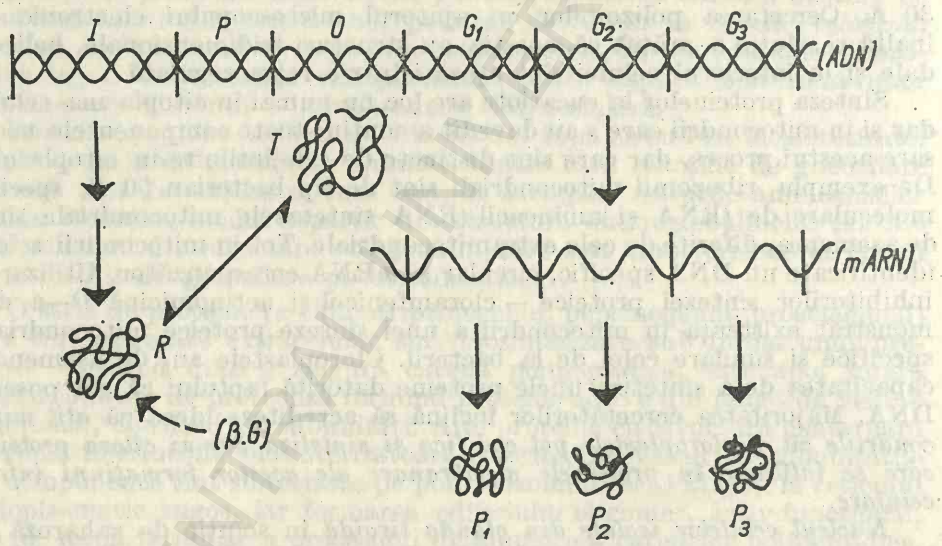


Fig. 21.8. — Reglarea sintezei enzimelor sistemului lactozic (după J. Monod). *I* — gena-reglator ; *R* — proteina represor ; *O* — segmentul operator al DNA ; βG-molecula galactozidului inductor ; *T* — proteina represor în stare asociată cu segmentul operator al DNA ; G_1, G_2, G_3 — gene structurale care controlează sinteza celor trei enzime din sistem ; P_1, P_2, P_3 — proteine-enzime sintetizate în sistem.

corespunzătoare şi care controlează sinteza polipeptidelor sau proteinelor. Gena operator poate fi blocată, inactivată de un *represor citoplasmatic*, elaborat de o *genă reglatoare*. Acest represor blochează gena operator şi sistează biosinteza de *m*RNA şi de enzime necesare biosintezei proteinelor. La rîndul ei biosinteza *represorului* este controlată de metaboliţi specifici denumiţi *efectori*, care la rîndul lor pot fi *inductori* sau *represori*.

Sinteza enzimatică indusă sub acțiunea unor factori denumiți *inductori* a fost demonstrată experimental pentru numeroase microorganisme. Astfel, celulele de *Saccharomyces cerevisiae* care de regulă cresc pe medii nutritive cu glucoză dacă sînt crescute pe medii cu galactoză după o perioadă de *lag* sînt capabile să elaboreze un sistem enzimatic capabil să degradeze galactoza; alte microorganisme sub acțiunea amidonului sintetizează amilază, sub acțiunea triptofanului — triptofanază, sub acțiunea penicilinei — penicilinază etc. Acest proces a fost denumit *sinteză enzimatică indusă*, iar compusul care-l declanșează *inductor*. Procesul de sinteză enzimatică indusă a fost detaliat studiat în cazul β-*galactozidazei* din *E. coli*. În mod obișnuit celulele de *E. coli* conțin 1—3 molecule de β-galactozidază, dar sub acțiunea *metil*-β-*galactozidului*, care s-a dovedit un inductor excepțional, celulele acestui microorganism pot sintetiza pînă la 2 000 molecule de enzime, atingînd o viteză maximă de sinteză după 3—4 minute de la adăugarea inductorului. Inductorul nu are nici o influență asupra structurii enzimei; *el declanșează* o sinteză sporită de enzimă pentru care celula microorganismului are informația genetică necesară înscrisă în molecula de DNA.

Sinteza enzimelor poate fi însă și inhibată sau *represată*. Astfel, celulele de *E. coli* sintetizează cu o viteză constantă arginină, atunci cînd sînt cultivate pe medii normale de cultură și cînd activitatea enzimei *ornitin transcarbamilaza* este constantă. Dacă în meidul de cultură se introduce arginină activitatea acestei enzime scade considerabil. Arginina acționează ca un represor și inhibă biosinteza enzimei, deoarece celulele de *E. coli* „spălate" și resuspendate într-un mediu de cultură obișnuit pot din nou sintetiza ornitin transcarbamilază și deci sînt *derepresate*. Represia în acest caz se realizează prin mecanismul de feed-back cu ajutorul enzimelor allosterice (v. cap. 6). Un caz deosebit de represie a fost întîlnit în culturile de *Salmonella* care sintetizau histidina. Dacă în mediul de cultură se introduce histidină toate cele patru enzime care alcătuiesc setul enzimatic necesar biosintezei (v. cap. 19) sînt concomitent inhibate sau represate.

Aceste date experimentale descrise amănunțit de A m e s și H a r t m a n (1963), M a r t i n (1963) și Z a b i n (1963), susțin ipoteza emisă de J a c o b și M o n o d deoarece prin formarea enzimelor induse inductorul acționează ca un efector și inactivează represorul iar represia genei-operator este îndepărtată. Rezultatul acestei depresii este sinteza de *m*RNA de către cistroni și drept urmare sinteza de proteine.

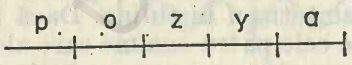
Un alt tip de represori sînt *aporepresorii* care reglează sinteza enzimelor represate și sînt activi în prezența unor efectori specifici corespunzători genei-operator.

Represorii sînt proteine cu două suprafețe allosterice (J a c o b și M o n o d, 1963) din care cauză ei pot reacționa prin intermediul unui centru allosteric cu nucleotidele care alcătuiesc gena operator, iar prin cel de-al doilea centru allosteric cu efectorul. Interacțiunea represor/efector determină în ultimul modificări care scad afinitatea lui pentru gena operator și deci îl inactivează. S-a demonstrat experimental că gena reglator a *lac* operonului este o proteină represor cu o masă moleculară de 160 000 și are structura unui tetramer.

Represorii sînt substanțe care nu afectează mecanismul de reglare și viteza de sinteză a enzimelor care participă la realizarea principalelor

căi metabolice. Sinteza și concentrația acestor enzime s-a dovedit a fi independente de prezența în celulă a inductorilor și represorilor și au fost denumite *enzime constitutive*.

Un alt aspect al biosintezei proteinelor rezidă în alternativa „o genă-o proteină", deci o genă codifică sinteza unei singure molecule de *m*RNA sau „un operon-o proteină" (Horowitz și Leupold, 1951). Timp îndelungat a fost admisă ipoteza „o genă - o proteină" sau „o genă - o enzimă", expusă detaliat în monografia lui Chantrenne (1961), însă numeroase date experimentale obținute de Attardi și alții (1963) Ohtaka și Spiegelman (1963) și Spiegelman și Hayashi (1963) precum și recenta lucrare a lui Fiddes (1977) privind genele suprapuse vin în sprijinul ipotezei că o moleculă policistronică de *m*RNA se poate sintetiza pe un *operon*. Studiul moleculei de *m*RNA și a biosintezei enzimelor care participă la biosinteza histidinei în microorganismul *Salmonella typhimurium*, realizat de Martin (1963) a scos în evidență faptul că masa moleculară a *m*RNA sintetizat de acest microorganism are o constantă de sedimentare de 34 *S*, ceea ce este mult prea mare pentru codificarea oricăreia din cele nouă enzime din setul enzimatic al biosintezei histidinei. Masa moleculară a *m*RNA corespunde cu dimensiunea operonului his și deci acest *m*RNA formează cu ribozomii un complex capabil să sintetizeze toate polipeptidele codificate în operon. *Lac* operonul celulelor de *E. coli* în prezența lactozei și a altor galactozide sintetizează în mod coordonat trei enzime diferite: β-*galactozidaza*, care hidrolizează galactoza, *tiogalactozid transacetilaza*, care transferă gruparea acetil de la acetil~SCoA la acceptorul galactozidic și *galactozid permeaza*, care reglează pătrunderea galactozei în celulă. În operonul *lac* genele sînt așezate după schema următoare:



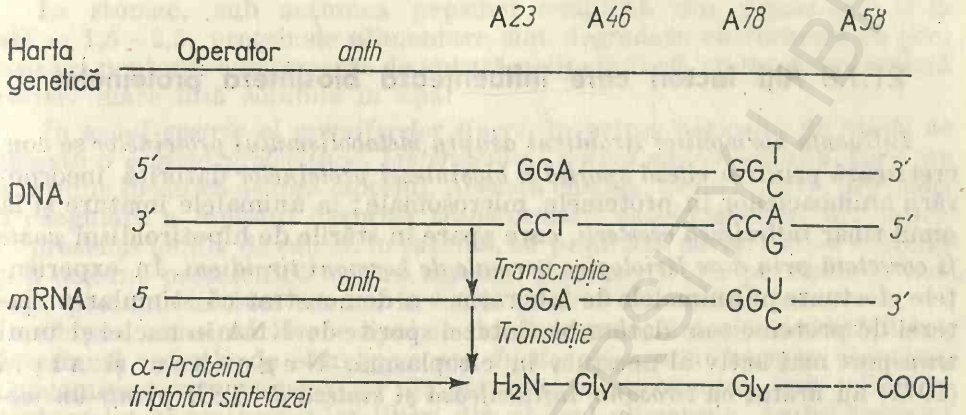
unde *p* — este gena promotor care leagă RNA-polimeraza; *o* — gena operator; *z* — gena pentru β-galactozidază; *y* — gena pentru permează și *a* — gena pentru transacetilază. În studii similare efectuate, în deosebi, pe microorganisme s-a demonstrat că există o *strictă colinearitate între harta genetică* a microorganismului *și secvența aminoacizilor în molecula proteinelor sintetizate*. Acest fapt a fost demonstrat fără echivoc în cazul β-galactozidazei și genei ei, pentru α-proteina fagului T4 și gena ei și pentru alte proteine (Guest, Yanofsky, 1966, Yanofsky și alții, 1967).

La aceste dovezi experimentale trebuie să adăugăm faptul că sinteza *m*RNA în toate genele operonului este controlată unidirecțional, începînd de la gena operator, și deci există *o polaritate a procesului de biosinteză*. Sintetizînd datele experimentale obținute pentru operonul triptofanului și α-proteinei din *E. coli* Yanofsky și alții (1961, 1966, 1967) au întocmit o reprezentare schematică a interrelațiilor dintre toți factorii care participă la biosinteza proteinelor.

În regiunea operatorului autorii găsesc o extremitate *anth* capabilă să sintetizeze antranilat sintetaza; transcripția *m*RNA începe de la această extremitate care reprezintă după cum se vede capătul 5'-terminal al

moleculei de *m*RNA. Aceiași polaritate a biosintezei proteinelor a fost întîlnită și în cazul β-galactozidazei și triptofan sintetazei în celulele de *E. coli*.

Conceptul operonului elaborat de J a c o b și M o n o d este aplicabil nu numai la microorganisme dar și celulelor animale și vegetale, unde însă în reglarea biosintezei proteinelor participă și *histonele*. DNA nuclear la



organismele pluricelulare formează complecși cu histonele și sub formă de nucleohistone este inaccesibil pentru biosinteza RNA-DNA dependent. B o n n e r și c o l a b. (1963 *a*, *b*) M o o r e (1963) și a l ț i i au arătat că această aserțiune este o realitate în cazul cromatinei celulelor de mazăre și respectiv în dezvoltarea embrionului de broască și în nucleii celulelor tiroidiene de vițel.

Rolul histonelor după alți autori nu s-ar rezuma numai la această funcție: ele ar îndeplini și protecția DNA contra enzimelor hidrolitice specifice. Controlul sintezei proteinelor în timpul embriogenezei pare a fi realizat prin mecanisme mai complicate. De exemplu, hemoglobina embrionului HbF = $\alpha_2\gamma_2$ este substituită la noul născut treptat cu HbA = $\alpha_2\beta_2$, deci formarea catenelor γ este represată în folosul biosintezei catenelor β. Un alt exemplu îl poate constitui compoziția testiculelor peștilor teleosteieni: la indivizii imaturi se întîlnesc histone iar la cei maturi acestea sînt înlocuite cu protamine, ș.a.m.d.

Structura primară a proteinelor precum și marea diversitate structurală a acestor biomolecule sînt condiționate genetic. În sprijinul acestei afirmații, pe lîngă dovezile expuse mai înainte, vin și numeroase fapte experimentale acumulate de biochimie și de genetică privind *mutațiile*, procesele de *deleție* și *inserție*, însoțite întotdeauna de modificarea structurii primare a proteinelor. Numeroase boli ereditare (hemoglobinopatiile, hemofilia *A* și *B*, intoleranța la fructoză, fructozemia, diabetul infantil, gangliozidozele, lipidozele, dereglările ereditare ale metabolismului unor aminoacizi etc.) sînt rezultatul unor substituiri în structura primară a proteinelor a unor resturi de aminoacizi cu resturile altor aminoacizi. Aceste substituiri codificate genetic, ca urmare a modificării DNA-cromozomial, sînt însoțite de alterarea funcțiilor pe care proteina respectivă le îndeplinea în celulă sau în organism. Mecanismul acestor substituiri a

fost bine studiat în cazul hemoglobinei umane și primele dovezi experimentale directe au fost aduse de I n g r a m (1956) și amplificate ulterior în diverse laboratoare (v. I n g r a m, 1972). Rolul structurii primare în asigurarea funcțiilor biologice ale peptidelor, polipeptidelor și proteinelor precum și unele dovezi privind evoluția acestora au fost detaliat expuse în capitolele 2—7.

21.1.8 Alți factori care influențează biosinteza proteinelor

Influența hormonilor tiroidieni asupra metabolismului proteinelor se concretizează printr-o *viteză sporită a biosintezei proteinelor* datorită încorporării aminoacizilor în proteinele microsomale; la animalele imature și la omul tînăr *întîrzierea creșterii*, care apare în stările de hipotiroidism *poate fi corectată prin doze fiziologice normale de hormoni tiroidieni*. În experiențele efectuate pe animalele de laborator s-a demonstrat că stimularea sintezei de proteine s-ar datora biosintezei sporite de RNA în nuclei și unui transport mai activ al acestuia în citoplasmă. N e g o e s c u și a l ț i i (1971) au arătat că *tiroxina influențează și sinteza de TSH printr-un mecanism specific, acționînd deci și asupra biosintezei proteinelor hipofizare*.

Rolul hormonilor tiroidieni în metamorfoza amfibienilor este bine cunoscut. Plecînd de la această situație, T a t a (1967) a arătat că inducția metamorfozei la *Rana catesbiana* cu ajutorul hormonilor tiroidieni este însoțită de o creștere bruscă a numărului de proteine și enzime sintetizate în țesutul hepatic; mai mult, toate tipurile de RNA din nucleu sînt sintetizate într-o cantitate mai mare, iar activitatea lor specifică în citoplasmă este crescută. Studiul electronomicroscopic al distribuirii ribozomilor în citoplasma animalelor normale și tratate cu hormoni tiroidieni a arătat, de asemenea, modificări de principiu (T a t a, 1967 b; P a l a d e, S i e k e w i t z, C a r o, 1962) în țesuturile hepatice ale multor specii de animale.

Hormonul de creștere determină și o creștere a utilizării acetatului marcat pentru sinteza proteinelor din cortex și încetinește sinteza proteinelor în toate organele cu excepția ficatului.

Efectul anabolic asupra proteinelor se manifestă prin diminuarea catabolismului aminoacizilor și eliminarea redusă de creatinină, amoniac și uree. Hormonul de creștere favorizează transportul aminoacizilor în celulă, facilitînd sinteza proteică în ficat, prin stimularea RNA și simpla creștere a concentrației intracelulare a aminoacizilor. Ribozomii din țesuturile animalelor hipofizectomizate sintetizează proteine mult mai lent; capacitatea lor este restabilită după administrarea de hormon de creștere.

În literatură au fost semnalate, de asemenea, și efecte ale α-MSH, asupra sintezei proteinelor, de exemplu, stimularea sintezei proteice în ficatul de șobolan alb în curs de regenerare după o hepatectomie cronică-parțială (V á n d o r, S i m o n, A n d a și B u d a v á r i, 1975), dar confirmarea lor de către alți autori nu a fost încă făcută.

21.2 DIGESTIA ŞI ABSORBŢIA PROTEINELOR

Digestia proteinelor alimentare este realizată de către proteinaze sau enzime proteolitice, localizate la nivelul tractului gastro-intestinal şi începe în stomac, deoarece în salivă enzimele proteolitice sînt absente.

În stomac, sub acţiunea pepsinei rezultată din pepsinogen şi la pH = 1,5—2,5, proteinele alimentare sînt degradate cu formare de proteoze şi peptone, componente de natură polipeptidică, cu masă moleculară relativ mare însă solubile în apă.

În sucul gastric al mamiferelor tinere, în prima perioadă de viaţă, se găseşte o *enzimă proteolitică, labfermentul, renina sau chimozina*, care are o acţiune specifică asupra laptelui. Această enzimă, pe de o parte, provoacă o coagulare a laptelui datorită transformării cazeinogenului din lapte, în prezenţa ionilor de calciu, în cazeină, iar pe de altă parte, renina exercită şi o acţiune proteolitică asupra cazeinei formate. După perioada de lactaţie prezenţa acestei enzime în sucul gastric este neînsemnată.

Chimul alimentar trece apoi în duoden unde, datorită acidităţii lui, determină secreţia de către *mucoasa duodenală* a unui hormon *secretina*. Concomitent este secretat un alt hormon, pancreozimina, sub influenţa proteozelor şi aminoacizilor liberi din chimul alimentar. Ambii hormoni stimulează şi secreţia pancreasului: secretina determină eliberarea apei şi sărurilor minerale, iar pancreozimina secreţia enzimelor pancreatice. Sucul pancreatic conţine Na^+, Cl^- şi bicarbonat, are un pH cuprins între 7—8 din care cauză chimul alimentar trecînd în duoden îşi schimbă pH de la 4—4,5 la 6—6,5, pentru ca apoi în intestinul subţire pH să devină alcalin (de la 7—7,5 la 8,0).

Sucul pancreatic conţine sub formă de *precursori inactivi*, denumiţi *zimogen proenzime, tripsinogen, chimotripsinogen, procarboxipeptidază şi proelastază*. Aceşti precursori trec în formă activă sub acţiunea *enterokinazei* sau a *tripsinei*.

Tripsina şi *chimotripsina degradează hidrolitic proteozele* şi *peptonele cu formare de peptide*, alcătuite din 6—9 aminoacizi, dipeptide şi într-o măsură mai mică, aminoacizi liberi. Carboxipeptidaza hidrolizează legătura peptidică dintr-o moleculă de peptidă care se găseşte în vecinătatea unei grupări carboxil libere, dînd naştere la aminoacizi liberi.

Degradarea produşilor de hidroliză rezultaţi după acţiunea sucului pancreatic este continuată în *intestinul subţire* de către *sucul intestinal* datorită enzimelor pe care acesta le conţine: *aminopeptidaze, dipeptidaze şi polipeptidaze*. Rezultatul final al digestiei la nivelul intestinului sînt *dipeptide şi aminoacizi liberi*.

În cursul procesului de digestie unele proteine nu sînt degradate enzimatic din cauza conformaţiei lor structurale. De exemplu, *fibroina şi keratina* sînt proteine *rezistente faţă de acţiunea enzimelor proteolitice* ale tractului gastrointestinal.

Proteinele sînt *absorbite la nivelul intestinului subţire* sub formă de *aminoacizi liberi*, rezultaţi în urma degradării enzimatice a macromoleculelor proteice. Transportul aminoacizilor în celulele mucoasei intestinale nu este un proces de difuzie ci un proces activ, diferit ca mecanism pentru diverse grupe de aminoacizi. În prezent, se admite că peptidele

cu masă moleculară mică sînt absorbite la nivelul intestinului, însă în limite extrem de reduse.

Un caz cu totul particular se întîlneşte în lumea animală, la *mamifere, unde în primele cinci zile după naştere, din intestinul subţire sînt absorbite mari cantităţi de globuline din colostrum, ceea ce creează posibilitatea apariţiei imunităţii noului născut faţă de diferiţi agenţi patogeni din mediul înconjurător.*

După absorbţia lor din peretele intestinal aminoacizii sînt transportaţi de curentul sanguin către ţesuturi. Concentraţia aminoacizilor este în mod particular mare, în primele ore după digestie, în ficat, intestin şi rinichi. La nivelul ţesuturilor aminoacizii nu sînt depozitaţi ca atare în stare liberă ci sînt fie metabolizaţi (v. cap. 18) fie utilizaţi pentru biosinteza proteinelor.

21.3 METABOLISMUL CROMOPROTEIDELOR

21.3.1. Biosinteza cromoproteidelor porfirinice

Elucidarea mecanismului de biosinteză a heteroproteidelor porfirinice a fost realizată în experienţele efectuate pe hematiile nucleate ale păsărilor domestice (pui de găină, gîşte) cu ajutorul izotopilor radioactivi ai carbonului. Precursorul hemului din molecula hemoglobinei este *protoporfirina*, care la rîndul ei poate fi sintetizată din *acidul δ-aminolevulinic*. În experienţe *in vitro* şi în prezenţa enzimei *δ-aminolevulinat sintetaza* (EC 2.3.1.37), izolată din ţesutul hepatic, acidul δ-aminolevulinic este sintetizat din glicocol şi succinil~SCoA. Enzima are o specificitate absolută pentru glicocol şi succinil~SCoA şi necesită în calitate de cofactori enzimatici ionii de Mg^{2+} şi piridoxal fosfatul; în acelaşi timp activitatea ei este inhibată de porfirine, metaloporfirine, bilirubină, hem, hemină, pigmenţi biliari etc. Două molecule de acid δ-aminolevulinic sub acţiunea enzimei *δ-aminolevulinat dehidraza* (EC 4.2.1.24) se condensează cu formarea unei molecule de *porfobilinogen* (fig. 21.9). Patru molecule de porfobilinogen în prezenţa *porfobilinogen deaminazei* condensează ulterior cu formarea unui compus intermediar care trece în *uroporfirinogen I* sau în *uroporfirinogen III*. Uroporfirinogenul III sub influenţa *coproporfirinogen oxidazei* este oxidat şi decarboxilat şi trece în *protoporfirina III*, iar aceasta în prezenţa *hem sintetazei* şi a ionilor de Fe^{2+} trece în *hem* (fig. 21.9). Fierul care este necesar acestei biosinteze este cedat de *transferină* şi încorporat în hematiile nucleate imature la nivelul măduvei osoase.

Toate porfirinele organismelor animale derivă de la porfobilinogen, iar protoporfirina III (nr. IX) este singura protoporfirină naturală şi sub formă de hem poate fi întîlnită în hemoglobină, hematină, miohemoglobină, choleglobină, sulfhemoglobină, citocromii grupelor *a, c, b, d*, peroxidază, catalază, citocromoxidază ş.a. În aceste proteine fierul este trivalent (catalază şi peroxidază), bivalent (hemoglobină, mioglobină) sau este oxidat şi redus în cursul unor reacţii reversibile (citocromii).

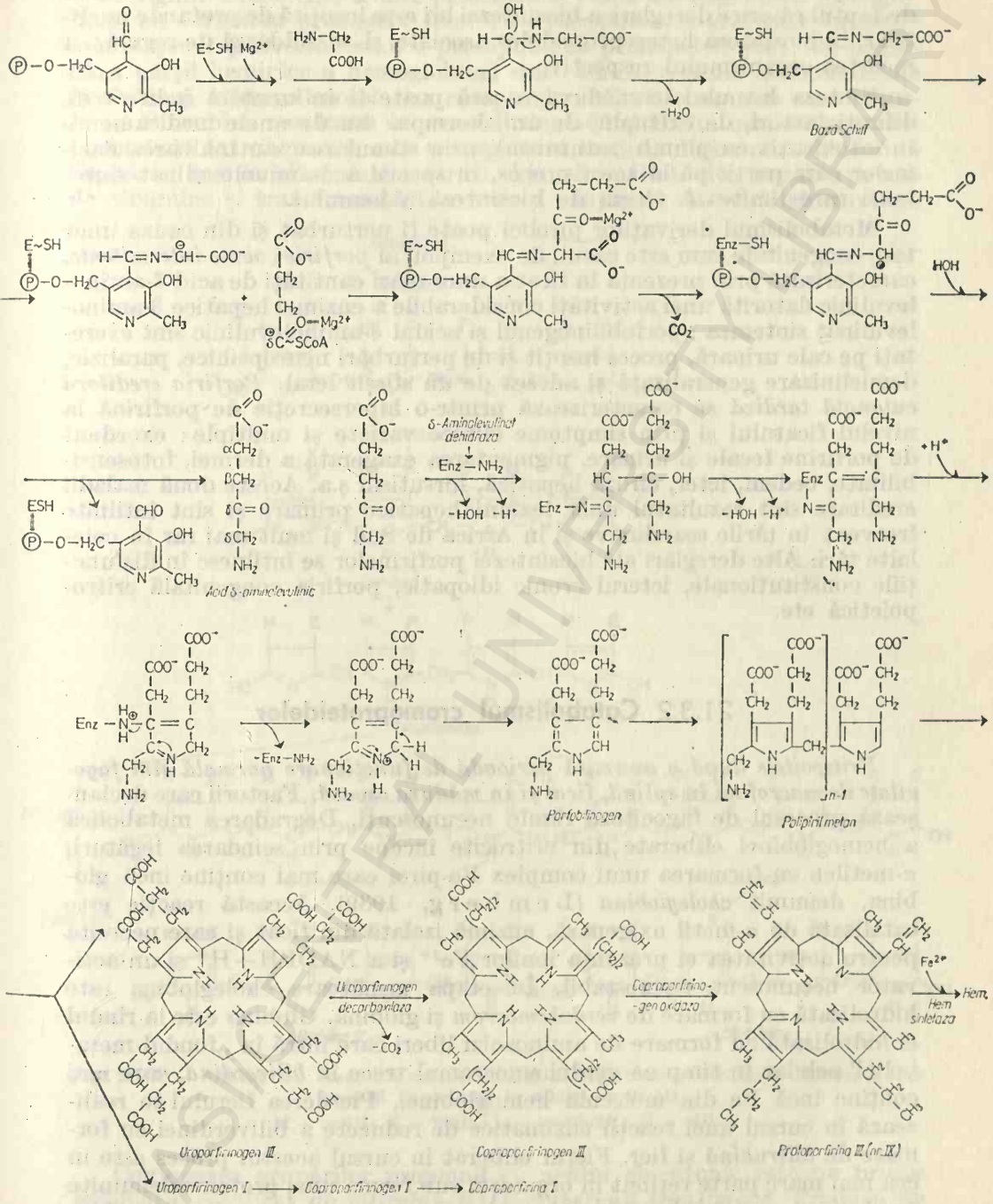


Fig. 21.9. — Etapele biosintezei porfirinogenelor, protoporfirinei și hemului.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Importanţa hemului pentru structura heteroproteidelor este subliniată de faptul că orice dereglare a biosintezei lui este însoţită de profunde modificări în biosinteza heteroproteidelor asociate, şi se soldează de regulă, cu moartea organismului respectiv.

Sinteza hemului în măduva osoasă poate fi influenţată indirect de diferiţi factori, de exemplu, de unii hormoni sau de unele medicamente în intoxicaţia cu plumb (saturnism), prin stimularea sau inhibarea enzimelor care participă la acest proces, în special a δ-aminolevulinat sintetazei care limitează viteza de biosinteză a hemului.

Metabolismul derivaţilor pirolici poate fi perturbat şi din cauza unor tare congenitale cum este cazul, de exemplu, al *porfiriei acute intermitente*, caracterizată prin prezenţa în ficat a unor mari cantităţi de acid δ-aminolevulinic datorită unei activităţi considerabile a enzimei hepatice δ-aminolevulinat sintetaza : porfobilinogenul şi acidul δ-aminolevulinic sînt excretaţi pe cale urinară, proces însoţit şi de perturbări neuropsihice, paralizie, demielinizare generalizată şi adesea de un sfîrşit letal. *Porfiria ereditară cutanată tardivă* se caracterizează printr-o hipersecreţie de porfirină la nivelul ficatului şi prin simptome clinice variate şi multiple : excedent de porfirine fecale şi urinare, pigmentarea exagerată a dermei, fotosensibilitate, oedem, icter, ciroză hepatică, hirsutism ş.a. Aceste două maladii ereditare sînt rezultatul unor leziuni hepatice primare şi sînt întîlnite frecvent în ţările scandinave şi în Africa de Sud şi mult mai rar în celelalte ţări. Alte dereglări ale biosintezei porfirinelor se întîlnesc în disfuncţiile constituţionale, icterul cronic idiopatic, porfiria congenitală eritropoietică etc.

21.3.2 Catabolismul cromoproteidelor

Eritrocitele după o anumită perioadă de funcţionare normală sînt fagocitate de macrofagi în splină, ficat şi în măduva osoasă. Factorii care declanşează procesul de fagocitoză rămîn necunoscuţi. Degradarea metabolică a hemoglobinei eliberate din eritrocite începe prin scindarea legăturii α-metilen cu formarea unui complex Fe-pirol care mai conţine încă globina, denumit *choleglobina* (L e m b e r g, 1939). Această reacţie este catalizată de α-metil oxigenază, enzimă izolată din ficat şi care necesită pentru activitatea ei prezenţa ionilor Fe^{2+} şi a NADPH+H^+ şi un activator necunoscut termostabil. În etapa următoare choleglobina este hidrolizată cu formare de *verdohemocrom* şi globină. Globina este la rîndul ei hidrolizată cu formare de aminoacizi liberi care intră în „fondul metabolic" celular în timp ce verdohemocromul trece în *biliverdină*, care mai conţine încă Fe din molecula hemoglobinei. Pierderea fierului se realizează în cursul unei reacţii enzimatice de reducere a biliverdinei cu formate de *bilirubină* şi fier. Fierul eliberat în cursul acestui proces este în cea mai mare parte reţinut în organism sub forma unei proteine denumite *feritina* (v. cap. 7), depozitat în măduva osoasă şi reutilizat pentru biosinteza de noi molecule de hemoglobină.

În figura 21.10 sînt redate principalele etape ale degradării hemoglobinei cu formarea produşilor finali : (+)-*urobilina*, *α-urobilina IX*, *stercobilinogenul* şi *stercobilina*. Se presupune că principalele sedii ale degradării părţii heminice a hemoglobinei sînt celulele reticulo-endoteliale ale ficatului şi măduva osoasă, iar compusul rezultat în acestea este bilirubina. Bilirubina rezultată în procesul degradării Hb în celulele reticulo-endoteliale extrahepatice este transportată la nivelul ficatului sub formă legată cu fracţia albuminelor serice. Ajunsă în ficat este rapid separată de albumine şi transformată în compuşi conjugaţi cu acizii glucuronici.

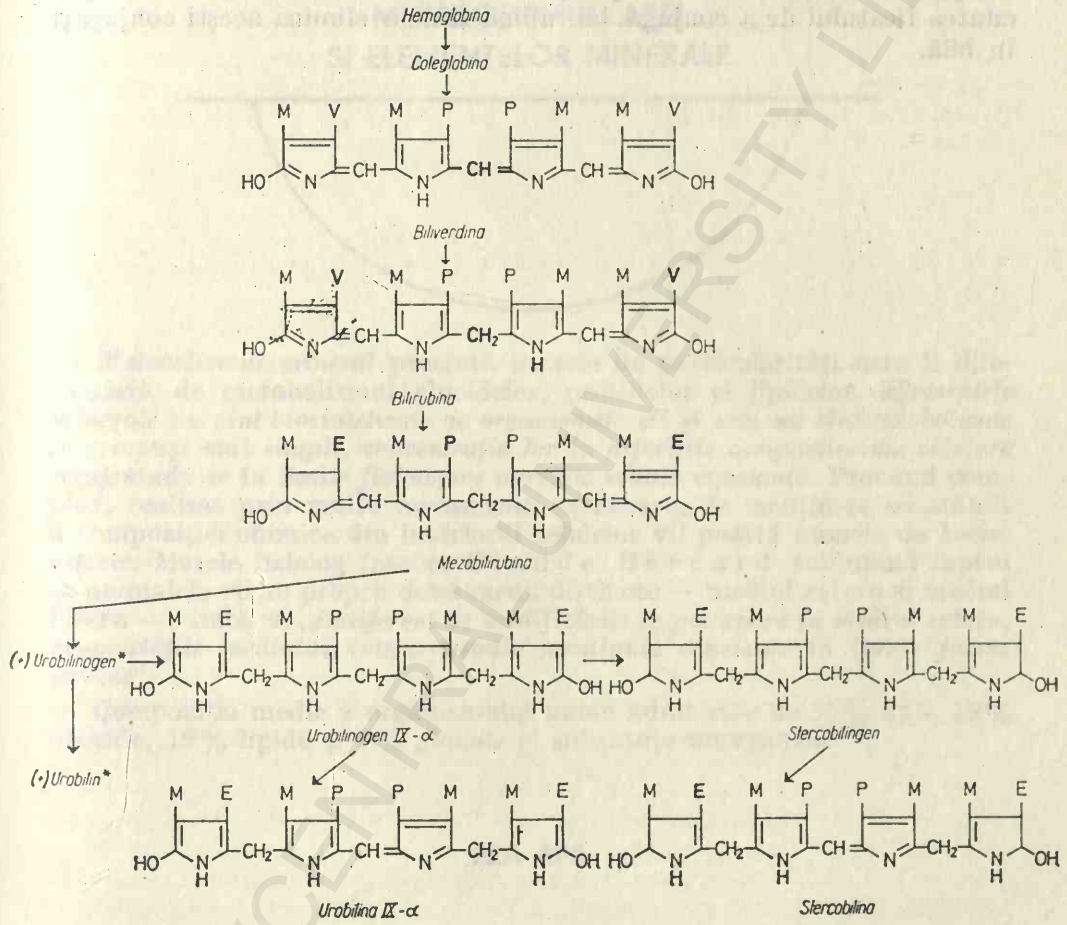


Fig. 21.10. — Principalele etape ale catabolismului hemoglobinei şi structura chimică a unor produşi importanţi în clinica medicală:
M — metil; V — vinil; P — propionil; E — etil.

Conjugarea grupărilor propionil cu acidul glucuronic este un proces enzimatic catalizat de *bilirubin-UDP-glucuronil transferaza*. Produşii de conjugare care pot fi de natură diversă — acil glicozide ale acidului aldobiouronic, mono- şi di-glucuronide, acili ai acizilor pseudoaldobiouronici

și hexuronozilhexuronic — sînt solubili în apă (spre deosebire de bilirubină care este liposolubilă) sînt eliminați prin canaliculii biliari în bilă, iar de aici ajung în intestin. La nivelul intestinului conjugații bilirubinei sînt hidrolizați de β-*glucuronidază*, iar bilirubina rezultată este transformată în cursul unor reduceri succesive cu formarea produșilor finali redați în figura 21.10.

Perturbarea catabolismului hemoglobinei este însoțită de apariția unor stări patologice grave pentru ficat : *icterul hemolitic*, *icterul mecanic* sau *prin obstrucție* și *icterul hepatogen*, majoritatea strîns legate de capacitatea ficatului de a conjuga bilirubina și de a elimina acești conjugați în bilă.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

22

METABOLISMUL APEI ȘI ELEMENTELOR MINERALE

Metabolismul mineral prezintă o serie de particularităţi care îl diferenţiază de metabolismul glucidelor, protidelor şi lipidelor. *Elementele minerale nu sînt biosintetizate de organismele vii şi nici nu sînt catabolizate la compuşi mai simpli, concentraţia lor în diferitele compartimente celulare menţinîndu-se în limite fiziologice normale relativ constantă.* Procesul complex, realizat prin multe mecanisme reglatoare, de menţinere constantă a compoziţiei chimice din interiorul celulelor vii poartă numele de *homeostazie.* Marele fiziolog francez Claude Bernard subliniind faptul că animalele vii au proprii două medii distincte — mediul extern şi mediul intern —, arată că „*indiferent de modificările ce pot apare în mediul extern, proprietăţile mediului intern trebuie menţinute constante în limite foarte strînse*".

Compoziţia medie a organismului uman adult este de 55% apă, 19% protide, 19% lipide şi 7% glucide şi substanţe anorganice.

22.1 APA

Apa este principalul component anorganic al materiei vii, reprezentînd solventul universal al vieţii. În interiorul celulelor *apa asigură mediul corespunzător desfăşurării tuturor proceselor specifice vieţii*: prin solubilizarea metaboliţilor crează diferenţe de concentraţii de-o parte şi de alta a membranei celulare permiţînd *schimburi cu mediul extracelular*; are un rol incontestabil în *reglarea temperaturii corpului*; reprezintă *un mijloc de transport în aparatul circulator*; participă în calitate de *reactant la procesele de hidroliză*; în mediu anaerob funcţionează ca *oxidant celular* etc.

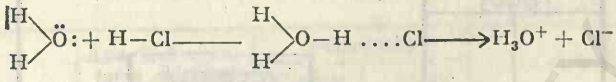
Un om adult în greutate de 70 kg consumă zilnic aproximativ 2 750 g de apă pe care și le procură din diferite băuturi consumate (650 g apă, lichide răcoritoare, sucuri de fructe etc.), din alimente (peste 750 g de apă zilnic) și parțial din apa rezultată în urma oxidărilor din organismul lui, la care se adaugă circa 1 litru, de care în situații deosebite se poate dispensa. În cursul oxidărilor celulare cea mai mare cantitate de apă rezultă prin oxidarea substanțelor de natură lipidică (100 g de lipide dau prin oxidare 107 ml de apă), după care urmează proteinele (41 ml la 100 g de proteine) și zaharurile (55 ml apă/100 g de zaharuri). În organismele animale, apa poate rezulta și din degradările oxidative care au loc la nivelul diferitelor țesuturi. În acest sens, în țesutul adipos au loc cele mai intense procese redox, astfel că din 500 g țesut pot lua naștere 535 ml apă. Are loc un fel de „topire" metabolică a țesuturilor corporale. Țesuturile elimină cantitatea de apă acumulată pe diferite căi (pe cale urinară 700 g, prin piele 500 g, la care se poate adăuga și cantitatea de 1 litru consumată suplimentar, peste nevoile lui absolute, prin plămîni 400 g și prin fecale circa 120—150 g).

Necesitățile organismului uman în apă sînt în funcție și de numărul caloriilor consumate/kg corp, de pierderile de apă prin transpirație, de starea fiziologică a organismului etc.

Apa, moleculă covalentă, prezintă o serie de proprietăți fizice : punctele de fierbere și îngheț, căldura de vaporizare, constanta dielectrică, tensiunea superficială etc. anormal de ridicate, ceea ce indică puternice forțe de atracție între molecule în stare lichidă. Între electronii nepartiCipanți ai oxigenului unei molecule de apă și sarcina parțial pozitivă a unui atom de hidrogen, aparținînd unei molecule de apă vecine, se naște o puternică atracție electrostatică, soldată în final cu stabilirea unor legături de hidrogen care vor asocia moleculele. Acest comportament este datorat faptului că molecula de apă este un dipol electric, realizat prin „separarea sarcinilor parțial electronegative (oxigenul, element electronegativ atrage electronii orbitalului de legătură rezultat printr-o hibridizare sp^3) de sarcinile parțial electropozitive (cei doi atomi de hidrogen). Datorită structurii spațiale și distribuției electronice a moleculei de apă, fiecare moleculă tinde să se asocieze prin legături de hidrogen cu alte patru molecule vecine. Această structură cu număr maxim de legături de hidrogen se întîlnește numai în structura cristalină a gheții; la 0°C în jurul unei molecule de apă existînd o medie de 3,4 alte molecule. La 100°C, mai există încă asociații moleculare în structura apei, acestea dispar însă complet la 600°C.

Atomii de hidrogen sau atomii de oxigen din molecula apei pot forma legături de hidrogen și cu atomii altor biomolecule, cu o structură mai mult sau mai puțin complicată, stabilindu-se legături între hidrogen și oxigen (aparținînd unei alte substanțe decît apa), azot sau fluor. Astfel, de exemplu, molecule de proteine, acizi nucleici sînt stabilizate din punct de vedere al structurilor lor tridimensionale, în apă, prin legăturile de hidrogen care apar între diferite grupări funcționale, cărora le este caracteristic un fenomen cooperativ (energia unui număr de legături de hidrogen este mai mare decît suma energiilor care caracterizează fiecare legătură, în parte).

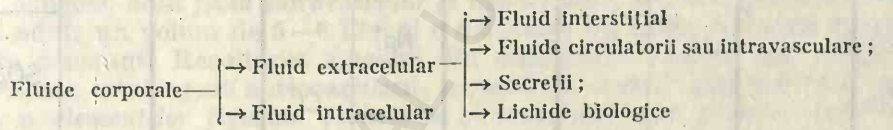
Proprietatea apei de a dizolva substanțe ionice sau covalente, cu masă moleculară mică se datorește constantei ei dielectrice neobișnuit de mari (80) și posibilității formării legăturilor de hidrogen. În cazul electroliților cu mase moleculare mici, de timpul Na^+Cl^-, cationii de sodiu sînt hidratați de dipolii apei care sînt orientați cu polul negativ spre ei, în timp ce anionii de clor sînt hidratați prin orientarea moleculelor de apă cu polul pozitiv, efectul global fiind depărtarea celor două tipuri de ioni, scăderea atracției electrostatice și deci dizolvarea substanței. În cazul substanțelor covalente cu mase moleculare mici, de tipul HCl, molecula de apă stabilește o legătură de hidrogen între electronii neparticipanți ai oxigenului din molecula apei și hidrogenul din structura HCl,



cu formarea ionului hidroniu și ionizarea anionului de clor.

În cazul polielectroliților de tipul proteinelor globulare, în care radicalii polari ai resturilor de aminoacizi sînt orientați spre exteriorul globulului proteic intrînd în interacții de tip ion-dipol cu moleculele de apă, dizolvarea se datorește aceluiași fenomen de hidratare și de stabilire a unui mediu dielectric puternic care nu permite apropierea și agregarea acestor biomolecule mari.

Cantitatea de apă din diferite organisme variază considerabil cu specia, organul, țesutul, vîrsta și este funcție de anotimp, de poziția organismului în scara evolutivă etc. În organismele animale și la om, apa este componentul principal al fluidelor, umorilor și secreților corporale, fiind distribuită în două principale compartimente.



În tabelul 22.1 se prezintă conținutul în apă și compoziția chimică sumară a principalelor fluide extracelulare și intracelulare.

În organismul omului adult, în interiorul celulelor, se găsește o cantitate de fluid (lichide) ce reprezintă aproximativ 50% din greutatea corpului, în timp ce întreaga cantitate de fluid extracelular constituie numai 20%, dintre care 15% — plasma sanguină și 5% fluidul cerebrospinal, limfă, fluidul sinovial, umoarea apoasă etc. În figura 22.1 se redă compoziția în electroliți și neelectroliți a fluidelor corpului, din care reiese că Na^+ este principalul cation extracelular, iar K^+ și Mg^{2+} — principalii cationi intracelulari. Dintre anioni, Cl^- și HCO_3^- predomină în exteriorul celulelor, iar fosfații, sulfații și anionii proteici există cu preponderență în interiorul celulelor.

Compoziția în electroliți a fluidului intracelular diferă mult de cea din lichidul interstițial înconjurător — diferențe datorate proceselor de transport activ bazate pe permeabilitatea selectivă a membranelor celulare, în funcție de proprietățile lor fizice și de metabolismul celular. Astfel se realizează transportul Na^+ și K^+, al glucozei și aminoacizilor. Distri-

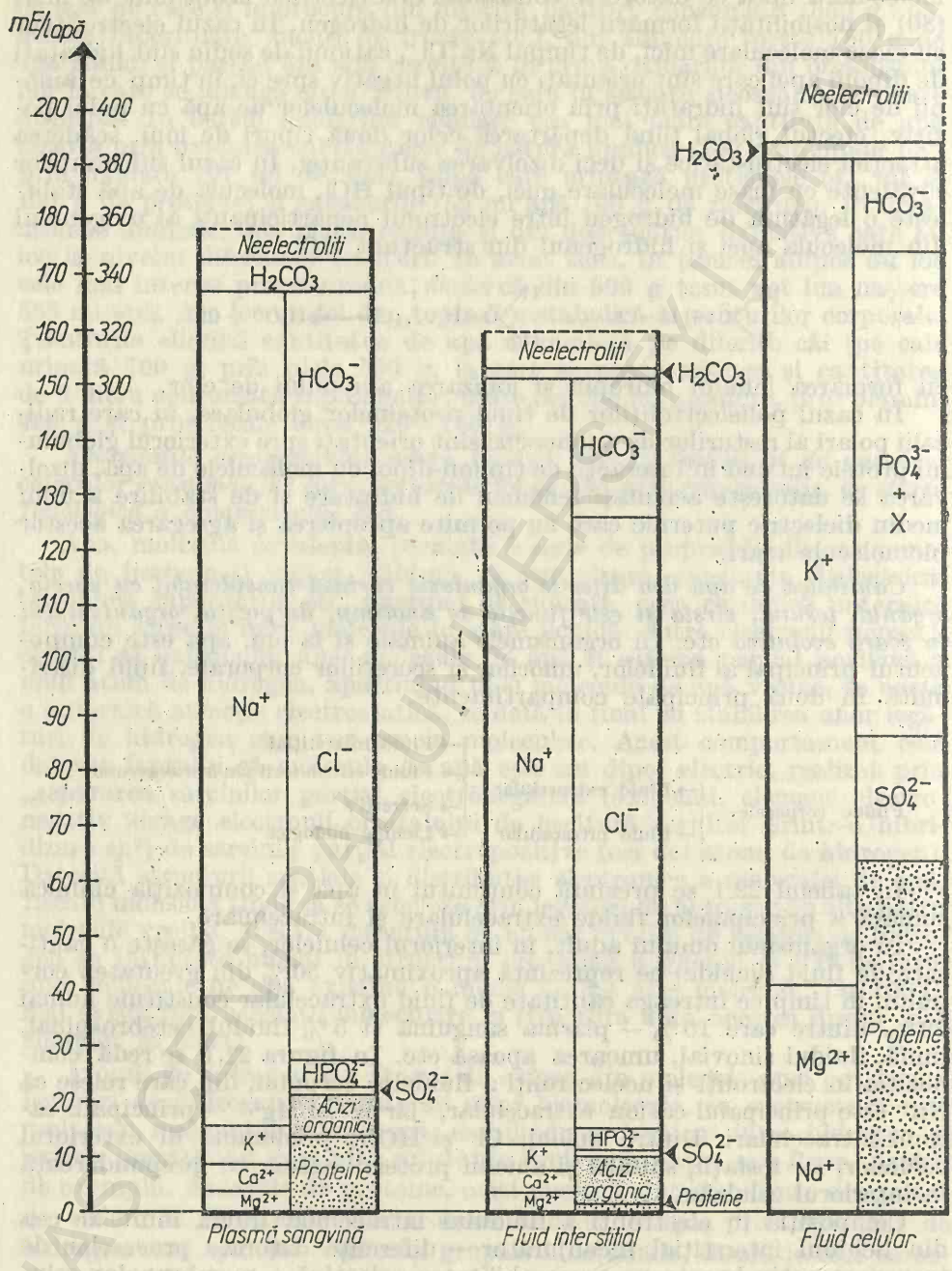


Fig. 22.1. — Compoziția fluidelor corpului omenesc în electroliți și neelectroliți.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

buția Cl^- și HCO_3^- între cele două compartimente este dependentă numai de fenomene electrochimice; fosfatul este acumulat prin procese necunoscute însă. Deoarece membranele celulare sînt puțin permeabile pentru SO_4^{2-}, există o diferență mare de concentrații între conținutul celular și fluidul extracelular, transportul activ fiind realizat contra acestor gradienți de concentrație.

TABELUL 22.1

Conținutul în apă și compoziția chimică sumară a diferitelor lichide ale corpului omenesc în cationi, anioni și alte biomolecule

Lichidul	*Apa, % din greutatea corpului*	*Principalii*		*Alte biomolecule*
		Cationi	*Anionii*	
Plasmă	5	Na^+	Cl^-	Proteine, glucoză
Lichid interstițial	15	Na^+	Cl^-	Glucoză, puține proteine
Lichid intracelular	45—50	K^+	HPO_4^{2-}	Proteine, metaboliți intermediari
Urină	—	Na^+	Cl^-	Uree, creatinină, SO_4^{2-}

22.2 SÎNGELE

Sîngele, *acest fluid intravascular și extracelular*, are în organismul omului adult un volum de 5—6 litri și o densitate de 1,060. Volumul sanguin este constant. Recoltarea sîngelui din organismul animal sau uman, în prezența unui agent anticoagulant, urmată de centrifugare permite separarea *elementelor figurate (eritrocite și leucocite)* și a *plasmei sanguine*. Dacă sîngele este lăsat să coaguleze, prin centrifugarea ulterioară se realizează separarea *serului sanguin*, colorat slab în galben datorită conținutului în carotenoizi și bilirubină. *Cheagul de sînge* conține elementele figurate prinse în rețeaua catenelor fibrilare ale fibrinei. Plasma sanguină conține aminoacizi, uree, bilirubină, creatină și creatinină, acid uric, monoze, polioze, acizi organici, lipide. Dintre constituenții anorganici, plasma sîngelui de om, conține cantități mari de Cl^-, HCO_3^-, Na^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, K^+ etc. (tabelul 22.2). Conținutul proteic total al plasmei sanguine variază de la 5,7 la 8,0 g/100 ml și este reprezentat de albumină, α-globuline, α_1-globulină (orosomucoid), α_2-globulină (glicoproteidă), α_1-lipoproteide, haptoglobulină, ceruloplasmina, protrombina, β-globulinele (β_1-lipoproteidele, lipoeuglobulina III, transferina, plasminogenul), globulina antihemofilică, fibrinogenul, crioglobulinele și γ-globulinele (anticorpi), componente separabile electroforetic datorită mobilităților diferite. Dintre enzimele prezente în plasmă amintim amilaza, fosfataza acidă și alcalină, aminotransferazele alaninei și acidului aspartic, lactat dehidrogenaza — ale căror nivele de activitate dau și indicații prețioase în diagnoza clinică a unor stări patologice.

*Principalii constituenți anorganici și organici și activitatea unor enzime din sîngele total, plasmă și ser**

Constituentul	*Singe*	*Plasmă sau ser*
1	2	3
Constituenți anorganici		
Bicarbonați (*mE*/l)	10,9—11,5	21,3—28,5
Cloruri (*mE*/l)		94,0—113
Fosfor total (mg/l)	314—443	89,0—149
— anorganic	21—38	25,6—41,6
— esterificat	186—286	25,0—45,0
— lipidic	124—150	69,0—97,0
Sulf total (mg/l)	1221	780
Iod total (μg/l)	—	38—60
Potasiu (*mE*/l)	68—95	3,40—5,20
Sodiu (*mE*/l)	10—22	138—151
Magneziu (*mE*/l)	4,24—6,30	1,70—2,30
Fier (mg/l)		
— bărbat	440—560	0,58—2,10
— femeie	420—480	— —
Cupru (mg/l)	0,72—1,10	0,79—1,56
Magneziu (μg/l)	8,6—16,5	1,80—3,10
Zinc (mg/l)	8,84—16,04	0,69—1,49
Seleniu (μg/kg)	20—220	— —
Constituenți organici		
Creatinină (mg/l)	—	6,6—18,0
Amoniac (mg/l)	0,22—0,74	0,04—0,33
Aminoacizi liberi (mg/l)	48,4—73,6	33,4—50,6
Histamină (μg/l)	16—89	0—15
Serotonină (μg/l)	90—180	1—25
Methemoglobină (% din hemoglobină)	0,0—1,1	— —
Carboxihemoglobină (% din hemoglobină)	0—8,2	— —
Bilirubină (mg/l)		2,6—14
Acid uric (mg/l)	16,0—31	20,8—76,4
Proteine totale (g/l)	180—210	
Fibrinogen (g/l)	—	2,6—3,3
Lipide totale (g/l)	4,08—6,12	3,5—8,5
Enzime **		
Lactat dehidrogenaza		140
Aspartat amino transferaza (GOT)		6,2—22,0
Alanin amino transferaza (GPT)		6,4—16,0
Piruvat kinaza		15,8—40
Creatin kinaza		3,3—23,0
Fosfataza alcalină		15,1—46,4
Fosfataza acidă		6,5—11,0

* Valorile indicate reprezintă domeniul în care pot varia concentrațiile constituenților menționați în sîngele uman, recoltat de la subiecții adulți normali. În unele cazuri se indică sexul subiectului sau se precizează modul de exprimare a valorii indicate.

** Activitatea enzimatică este dată în unități U, adică cantitatea de enzimă care catalizează transformarea unui micromol de substrat într-un minut, în condiții standard.

Concentrațiile principalilor componenți anorganici și organici din sînge, importanți pentru precizarea diagnosticului în clinica medicală, sînt redate în tabelul 22.3.

Eritrocitele sînt celulele anucleate, biconcave, a căror membrană are o structură mozaicată ce conține 49% proteine, 44% lipide și 7% glucide. Aceste celule se comportă ca un veritabil osmometru, umflîndu-se și con-

TABELUL 22.3

Principalele elemente minerale, substanțe azotate, proteine, lipide, glucide și vitamine prezente în lichidul cefalorahidian al omului (Valori normale)*

Constituentul	*Domeniul de variație*
Elemente minerale	
Bicarbonați (*mE*/l)	21,3—25,9
Cloruri (*mE*/l)	112—128
Fosfor (*mg*/l)	13,7—21,6
Potasiu (*mE*/l)	2,64—3,36
Sodiu (*mE*/l)	135—157
Calciu (*mE*/l)	1,96—2,60
Cupru (μg/l)	14—110
Substanțe organice	
Amoniac (mg/l)	0,062—0,466
Aminoacizi (mg/l)	9,6—15,2
Creatină (mg/l)	4,6—18,7
Creatinină (mg/l)	6—14
Uree (mg/l)	138—364
Mucoproteine (mg/l)	15—87
Lipide totale (mg/l)	7,66—17,4
Colesterol (mg/l)	2,19—5,71
Fosfolipide (mg/l)	2,09—8,89
Glucoză (mg/l)	500—900
Tiamină (μg/l)	13—17
Acid folic (μg/l)	10—30
Acid ascorbic (mg/l)	3—21

* Unele variații în conținutul unor constituenți ai lichidului cefalorahidian depind de nivelul de la care a fost prelevat lichidul : lombar, cisternal sau ventricular. Ilustrativă în acest sens este concentrația glucozei care variază în limite extrem de largi : 480 mg/l în cazul punctiei lombare și 900 mg/l în funcțiile suboccipitală și lombară.

tractîndu-se la scăderea sau creșterea presiunii osmotice. Într-o soluție hipotonică, membrana eritrocitară se rupe eliberînd conținutul celular — proces numit *hemoliză*, ce poate fi realizat de diferiți agenți tensioactivi (săpunuri, saponină, cloroform). Principala funcție a acestor celule este transportul O_2 și CO_2, realizat de prezența unei soluții 34% hemoglobină. Compoziția internă a eritrocitelor este menținută constantă printr-o serie de mecanisme care necesită energie, mecanisme în care sînt implicați ATP și ATP-aza dependentă de Na^+, K^+ și Mg^{2+}.

Principalele leucocite din sînge sînt leucocitele polimorfonucleare și limfocitele, cu un conținut deosebit de mare de ioni de Zn^{2+} și în enzime

respiratorii şi glicolitice. Aceste celule au un rol major în procesele imunologice din organismele vii.

Dacă se compară proporţiile de ioni din sîngele provenit de la diferite animale se constată multe similitudini, iar cantităţile relative de Na^+, K^+ şi Ca^{2+} sînt similare cu cele din apa de mare (100—2,16 şi respectiv 2,27 — în care cantitatea ionului sodic este considerată 100). Deşi există diferenţe în compoziţia ionică totală şi salinitatea totală, proporţiile relative similare atestă, după părerea unor autori, că viaţa îşi are originea în apele oceanice. Pentru majoritatea animalelor, calea spre viaţa terestră a fost : ocean→estuare→apă dulce→pămînt. Odată cu modificarea condiţiilor de viaţă, animalele au fost confruntate cu noi probleme care au condus la modificarea organelor respiratorii, a mecanismului de oxigenare a hemoglobinei sau a altor proteine cu funcţii similare (la moluşte şi artropode — *hemocianina*, la anelide marine — *hemeritrina* şi *cluorocruorina*) stabilirea unor mecanisme care să le permită adaptarea de la un mediu extern relativ constant (apa de mare) la un mediu extern extrem de variabil — viaţa terestră. În ciuda evoluţiei lor, animalele şi-au menţinut în sînge şi în celelalte fluide, compoziţia ionică relativă, apropiată de cea a apei de mare.

În timp ce compoziţia sîngelui tuturor animalelor este constantă (proporţiile relative ale Na^+, K^+ şi Ca^{2+}), sînt găsite mari variaţii în conţinutul ionic total şi deci în presiunea osmotică a sîngelui diferitelor animale. De exemplu dacă un animal tipic marin (exemplu, crabul paianjen *Maia*) este plasat în apă marină diluată, acesta nu se poate adapta noii concentraţii ionice, în final murind. Analiza sîngelui acestor animale indică pierderea sărurilor din sînge pînă cînd presiunea osmotică internă o egalează pe cea externă. Dacă experienţa se repetă cu un animal de estuar, ca micul crab de ţărm *Carcinus*, diluarea mediului extern este însoţită de o diminuare relativ mică a presiunii osmotice interne, care nu este fatală animalului. În cazul crabilor care-şi petrec o parte din viaţă în apă dulce şi o parte în apă sărată, există mecanisme speciale de adaptare la modificările presiunii osmotice ale mediului exterior.

22.3 FLUIDE, UMORI, SECREŢII ŞI LICHIDE BIOLOGICE

22.3.1 Fluidul interstiţial

Fluidul interstiţial *conţine concentraţii mai mari în anioni şi concentraţii mai scăzute în cationi decît cele care caracterizează plasma.* Componenţii chimici care realizează funcţia de „cimentare" a celulelor în entităţi de organe sînt acidul hialuronic şi mucoproteidele care formează un gel uşor de penetrat de metaboliţi cu mase moleculare mici (apă, ioni, glucoză, aminoacizi) şi un obstacol pentru proteine, virusuri, bacterii etc. Hialuronidaza este o enzimă care catalizează depolimerizarea acidului hialuronic, mărind permeabilitatea pentru metaboliţi cu mase moleculare

mari. Hormonii steroidici secretaţi de partea corticală a suprarenalei inhibă sinteza proteinelor constitutive ale ţesutului conjunctiv, scăzînd integritatea ţesutului.

22.3.2 Limfa

Limfa, fluid extracelular (1—2 litri) *circulă prin canalele limfatice şi prezintă o compoziţie chimică diferită de a plasmei şi variabilă cu sursă.* Raportul de concentraţii [albumine]/[globuline] este egal cu 3—5, fiind mult mai mare decît cel ce caracterizează plasma. Dacă considerăm compoziţia procentuală din limfă, care circulă la diferite nivele ale corpului omenesc adult se constată că limfa cervicală conţine 3% proteine, limfa subcutanată — 0,25% şi limfa hepatică — 6%.

22.3.3 Fluidul sinovial

Fluidul sinovial prezintă un *p*H de 7,3—7,4 este vîscos datorită prezenţei acidului hialuronic şi a mucopolizaharidelor secretate de celulele sinovium-ului, se formează prin ultrafiltrarea selectivă a serului şi are un conţinut proteic de 1% (raportul concentraţiilor [*albumine*] / [*globuline*] este aproximativ egal cu 4). Nu conţine fibrinogen şi nici lipide, iar concentraţia glucozei este variabilă. Dintre elementele minerale clorurile (107 *mE*/l) şi sodiul (136 *mE*/l) se găsesc în cantităţi mai mari. Aluminiul, cuprul, rubidiul, zincul şi fierul se găsesc în concentraţii mult mai mici (între 43 μg/kg pentru fier şi 540 μg/kg pentru rubidiu, de exemplu). Dintre substanţele organice sînt mai importante acidul uric (73 mg/l, acidul hialuronic (3,21 g/l), colesterolul (71 mg/l), fosfolipidele (138 mg/l).

22.3.4 Umoarea apoasă

Umoarea apoasă umple camera anterioară a ochiului, contribuind la menţinerea tensiunii oculare. La om, într-un volum mic de 0,125 ml, umoarea apoasă prezintă un conţinut proteic scăzut de 25 mg/100 ml şi concentraţii ionice ce amintesc de compoziţia plasmei. În camera posterioară, alături de umoarea apoasă se găseşte un gel de acid hialuronic într-o reţea de colagen. Schimburile de apă şi electroliţi dintre camerele anterioară şi posterioară cu ţesutul înconjurător au loc prin difuzie.

22.3.5 Fluidul cefalorahidian

Fluidul cefalorahidian provine din plexul coroid, este deversat în sînge prin vasele regiunii lombare, umplînd spaţiul subarahnoidian al creierului şi măduvii spinării. La omul adult, acest fluid în volum de

125—135 ml este regenerat la fiecare 3—4 ore. Compoziția chimică a fluidului cerebrospinal îl indică a fi un ultrafiltrat al plasmei : conține 10—40 mg proteine/100 ml (un raport [albumine]/[globuline] = 4), o concentrație de glucoză mai scăzută decît cea din plasmă, n-are lipide. Concentrația în ioni de Na^+ este virtual identică cu cea din plasmă, în timp ce $[K^+]$ este apreciabil mai scăzută. Concentrația Ca^{2+} din fluidul cefalorahidian este constantă. Dintre anioni, concentrația Cl^- este mai mare în fluidul cerebrospinal decît în plasmă, în timp ce $[HCO_3^-]$ în cele două compartimente este egală. În tabelul 22.3 sînt redate concentrațiile principalelor elemente minerale, substanțe azotate, proteine, lipide, glucide, vitamine și activitatea unor enzime din lichidul cefalorahidian uman.

22.3.6 Transpirația

Transpirația realizează prin evaporare, răcirea corpului. Ea are un volum și o compoziție variabilă în funcție de activitatea glandelor sebacee, cantitatea de lichide ingerate de individ, temperatura mediului extern, umiditatea și de o serie de factori hormonali. În cazul unor cantități mici de transpirație, concentrațiile metaboliților sînt ușor mai mari decît cele din plasmă.

22.3.7 Secrețiile lacrimale

Secrețiile lacrimale rezultă *în urma activității mixte a glandelor lacrimale și a unor glande sebacee accesorii* (glandele lui Z e i s și glandele meibomine) *realizează umectarea suprafeței corneei.* Concentrațiile electroliților din lacrimi sînt similare cu cele din plasmă. Proteinele într-o concentrație de 0,6—0,8 g% (raport [albumină]/[globuline]=2) scad tensiunea superficială permițînd umectarea suprafețelor epiteliale. Dintre proteine, enzima numită *lizozim* protejează corneea față de infecțiile cocice, prin acțiunea sa de a cataliza hidroliza acidului muramic din structura pereților celulari ai acestor microorganisme.

22.3.8 Saliva

Saliva este *rezultatul acțiunii a trei perechi de glande : glanda parotidă, glandele submaxilare și sublinguale, glandele palatine, labiale și linguale.* Dacă saliva rezultată din parotidă nu este vîscoasă, secreția celorlalte glande are un conținut ridicat în mucoproteide (în special mucină), ceea ce le face vîscoase. Compoziția, *p*H și volumul salivei sînt variabile de la un individ la altul și în cursul aceleiași zile *(variații circadiene).* *p*H salivei este 6,4—7,0. Dintre electroliți, concentrațiile în Na^+ sînt 20—40 *mE*/l, Ca^{2+} — 6 — 20 mg/100 ml, HCO_3^- — 10—20 *mE*/l. Zilnic sînt produși 1—2 l de secreții mixte hipotonice. Dintre substanțele organice alături de mucină (2,7 g/l), apar cantități mici de proteine, glucoză, uree, acid uric,

acid lactic, fenoli, cobalt, cupru, vitamine, enzime (lizozim, amilază) etc. În salivă s-au identificat activităţile enzimatice ale amilazei, fosfatazei şi carbonic anhidrazei. În tabelul 22.4 sînt redate concentraţiile unor elemente minerale în salivă.

TABELUL 22.4

*Compoziţia chimică a secreţiei salivare**

Constituentul	*Domeniul de variaţie*
Apă şi elemente minerale	
Apă (g/l)	994
Bicarbonaţi (mE/l)	2—13
Cloruri (mE/l)	15—31
Fosfor total (mg/l)	120—288
Ioduri (mg/l)	0,002—0,200
Potasiu (mE/l)	14—41
Sodiu (mE/l)	5,2—24,5
Cupru (μg/l)	50—760
Substanţe organice	
Uree (mg/l)	140—750
Amoniac (mg/l)	10—120
Acid uric (mg/l)	5—29
Proteine (g/l)	1,4—6,5
Mucine (g/l)	0,8—6,0
Lizozim (mg/ml)	pînă la 0,15
Amilază (mg/ml)	1,00
Acid lactic (mg/l)	10—50
Acid ascorbic (mg/l)	0,58—3,80

* Datele privesc secreţia salivară totală în repaus (cînd nu este stimulată natural sau artificial). Compoziţia salivei variază în funcţie de glanda care o secretă şi de debitul secreţiei.

22.3.9 Secreţiile gastrice

Secreţiile gastrice sînt rezultatul acţiunii a 10—30 milioane de celule ale cavităţii gastrice. Celulele mucoase şi celulele glandulare secretă un fluid vîscos, cu reacţie alcalină, bogat în mucoproteide. *Celulele principale* din peretele cavităţii gastrice elaborează *pepsinogenul* şi alte proteine, ioni de Na^+, Cl^- şi HCO_3^- care asigură un mediu slab alcalin. *Celulele parietale* din regiunea fundică secretă o soluţie de HCl 0,16 *M*, KCl 0,007 *M*, urme din alţi electroliţi şi aproape deloc material organic. Ambele secreţii sînt izotonice faţă de serul sanguin. Majoritatea celulelor secretă un mucus format din acid sialic, proteine, substanţe de grupă sanguină şi o mucoproteidă cu o masă moleculară mică ce funcţionează ca „*factor intrinsec*". Concentraţia în ioni H^+ este de 10^6 ori mai mare decît cea din plasmă. Mecanismul celular de producere a HCl este încă necunoscut. Secreţia celulelor parietale este stimulată de *histamină* şi de un grup de hormoni —

gastrine—produși de mucoasa pilorică a stomacului. Producerea de gastrină este inhibată de *secretină*, un hormon produs de mucoasa duodenală. Deoarece gastrina stimulează și secreția celor doi hormoni pancreatici se consideră că trei hormoni — *gastrina*, *secretina* și *glucagonul* — controlează activitățile secretorii ale stomacului, pancreasului și intestinului subțire. Ritmicitatea contracției intestinului subțire este controlată de *coherină*, o polipeptidă secretată de neurohipofiză. Compoziția chimică a sucului gastric este redată în tabelul 22.5.

TABELUL 22.5

Compoziția chimică a sucului gastric *

Constituentul	*Domeniul de variație*
Apă și elemente minerale	
Apă (g/l)	991—995
Bicarbonați (mE/l) **	42—45
Cloruri (mE/l)	77,6—159
Fosfor (mg/l)	6—180
Potasiu (mE/l)	6,4—16,6
Sodiu (mE/l)	18—70
Calciu	2—4,8
Magneziu (mE/l)	0,3—3,0
Substanțe organice	
Creatinină (mg/l)	12—34
Acid uric (mg/l)	8—69
Histamină (μg/l)	7—48
Proteine (g/l)	2,2—3,4
Mucine (g/l)	0,6—15
Pepsină (KU/24h)	28,8—30
Acid ascorbic (mg/l)	1,5—15,0
Hexoze (mg/l)	320

* Sucul gastric recoltat prin metodele obișnuite în clinică (sonda *gastrică*) nu este un suc gastric pur, deoarece este în majoritatea cazurilor contaminat cu secreții esofagiene, resturi alimentare, salivă, sucuri pancreatice, sucuri duodenale și chiar cu bilă, ca urmare a reflexelor inevitabile provocate de excitarea mecanică. Din această cauză concentrația diferitelor componente variază în limite largi și constituie un criteriu orientativ pentru medicul curant.

** Se referă exclusiv la secreția celulelor epiteliale.

22.3.10 Secreția pancreatică

Secreția pancreatică, într-un volum de 500—800 ml/zi, ca un *p*H de 7,4—8,3 are după toate probabilitățile *o origine dublă*: *celulele epiteliale ale tubulilor elaborează o secreție apoasă bogată în bicarbonați, iar celulele*

epiteliale ale acinilor — un lichid vîscos bogat în enzime. Enzimele prezente în secreţia pancreatică sînt *tripsina, chimotripsina, elastaza, carboxipeptidaza, lipaza, α-amilaza, deoxiribonucleaza* şi *ribonucleaza*, dintre care primele cinci sînt elaborate sub formă de zimogen. Secreţia izostonică conţine Na^+ (148 *mE*/l), K^+ (4 *mE*/l), Ca^{2+} (6 *mE*/l), Cl^- (80 *mE*/l), HCO_3^- (80 mE/l), HPO_4^{2-} (1 *mE*/l) etc. Secreţia sucului pancreatic este sub control dublu neural şi hormonal. *Secretina* este un hormon care stimulează secreţia pancreatică la nivelul tubulilor, cu o compoziţie ionică normală, apoasă, bogată în bicarbonaţi şi cu mici activităţi enzimatice. *Colecistokinina*, al doilea hormon duodenal (numită iniţial *pancreozimina*), acetilcolina şi excitarea nervului vag stimulează secreţia pancreasului la nivelul acinilor, rezultînd un lichid bogat în enzime.

22.3.11 Secreţiile intestinale

Secreţia intestinală este slab alcalină, *cu o compoziţie chimică variabilă*, în care sînt incluse multe enzime: *aminopeptidaze, dipeptidaze, enterokinază, maltază, zaharază, lactază, nucleaze, nucleotidaze, nucleozidaze, fosfataza alcalină, fosfotidilcolinază* etc., proteine (albumine, γ-globuline, mucoproteine), iar dintre elementele minerale clorurile (103—150 mE/l), sodiul (138—150 mE/l) şi potasiu (4—10 mE/l) sînt mai importante.

22.3.12 Secreţia biliară

Bila este elaborată continuu de celulele poligonale ale ficatului fiind stocată şi concentrată în vezica biliară. Colecistokinina stimulează contracţia vezicii biliare şi deci eliminarea conţinutului ei în duoden. Na^+, K^+, Cl^-, creatinina şi colesterolul sînt prezenţi în bilă în concentraţii asemănătoare celor din plasmă. Colesterolul, acizii biliari şi pigmenţii biliari sînt metaboliţi proprii acestei secreţii. Bilirubina este un metabolit care poate fi concentrat de aproximativ 1 000 ori, la acest nivel. Vezica biliară are o capacitate de 50—60 ml, un *p*H 5,6 şi conţine K^+, Ca^{2+}, Cl^-, HCO_3^-. Acizii biliari *(acidul glicocolic, taurocolic, deoxicolic, chenodeoxicolic* etc.) sînt sintetizaţi în ficat (v. cap. 18) şi au rol în emulsionarea, hidroliza şi absorbţia lipidelor. Raportul concentraţiilor principalilor acizi biliari — acidul glicocolic : taurocolic — este de 3 : 1. Pigmenţii biliari *(bilirubina, biliverdina, coproporfirina)* derivă din degradarea porfirinelor la nivelul sistemului reticulo-endotelial hepatic. Dintre lipidele biliare, menţionăm fosfatidilcolina, colesterolul şi acizii graşi — a căror solubilităţi sînt dependente de prezenţa sărurilor biliare. Fosfataza alcalină prezentă în secreţia biliară se aseamănă cu enzima plasmatică de provenienţă osteoblastică.

Compoziţia bilei hepatice şi bilei veziculare sînt redate în tabelul 22.6.

TABELUL 22.6

Compoziția bilei hepatice și bilei veziculare în săruri minerale și substanțe organice

Constituentul	Domeniul de variație	Domeniul de variație
	Bilă hepatică	Bila veziculară
1	2	3
Săruri minerale		
Bicarbonați (mE/l)	30	19
Cloruri (mE/l)	89—118	7—110
Fosfor total (g/l)	0,06—0,23	1,40
Potasiu (mE/l)	2,6—12	8,4—17,5
Sodiu (mE/l)	131—164	146—360
Calciu (mE/l)	3,4—4,2	4,0—33
Fier (mg/l)	0,4—3,0	0,6—3,8
Cupru (mg/l)	0,35—2,0	
Substanțe organice		
Uree (mg/l)	236	200—450
Colină (g/l)	0,22—0,92	—
Bilirubină (g/l)	0,12—1,35	0,36—6,30
Proteine (g/l)	1,4—2,7	4,5
Acizi grași (g/l)	1,6—4,1	24
Fosfolipide (g/l)	1,0—4,5	15—35
Colesterol (g/l)	0,8—1,8	3,1—16,2
Acizi biliari (g/l)	6,5—14	0—65
Acid folic (μg/l)	8—65	. . . . .
Acid lactic (mg/l)	. . . . .	130—180

* Bila obținută prin tubajul duodenal reprezintă de fapt bila hepatică însoțită de sucul pancreatic și de secrețiile duodenale; se prezintă ca un lichid colorat în galben sau brun pal (fracția *A*). Bila veziculară recoltată după injecția cu sulfat de magneziu este mai concentrată, deoarece vezica biliară concentrează bila hepatică și secretă mucopolizaharide și are o culoare brun roșcată, închisă (fracția *B*). Conține și ca secrețiile duodenale

22.4 ELEMENTELE MINERALE

Principalele elemente minerale, numite elemente esențiale, care se găsesc în organismele animale și participă la procesele de tamponare a conținutului celulelor vii, a osteoclastelor și osteoblastelor din sistemul osos, îndeplinesc rolul de catalizatori acizi sau participă la diferite reacții redox sînt: Na, K, Ca, Mg, Fe, P, Cl, S, Cu, Mo, Co, Mn, Zn, Cr, I; ele se găsesc în cantități mai mici, dar participă alături de elementele esențiale la diferite procese metabolice sau îndeplinesc rolul de stabilizatori ai structurilor tridimensionale. Elementele Ba, Sr, Pb, Ni, Hg nu sînt esențiale pentru metabolism și reprezintă acumulări necontrolate de procesele de excreție și de absorbție și se datoresc în cea mai mare măsură fenomenelor de poluare.

22.4.1 Sodiu, potasiu și clorul

Na^+ și Cl^- sînt principalii ioni ai fluidelor extracelulare, iar K^+ este concentrat în lichidul intracelular. Concentrația K^+ în interiorul celulei este mai mică decît concentrația Na^+ în exteriorul celulei, fapt datorat prezenței concomitente în celulă a mai multor substanțe osmotic active. Această distribuție cationică este esențială în transmiterea excitațiilor nervoase, în buna funcționare a mușchilor, în diferitele procese enzimatice etc. Clorul se găsește activ în fluidul extracelular și în plasmă. În urma transportului activ al ionilor de hidrogen prin mucoasa gastrică, ionii de Cl^-, care urmează aceeași cale metabolică, contribuie la sinteza HCl, necesar menținerii acidității stomacale. Omul, primește prin hrană, zilnic, 70—300 mE de Na^+. O treime din această cantitate este fixată în sistemul osos, în fluidul extracelular menținîndu-se o concentrație constantă de 135—140 mE/l. Homeostazia sodică este realizată prin reglarea excreției acestui ion, în funcție de aportul zilnic, reglare efectuată pe cale renală sub controlul *aldosteronului*, hormon mineralocorticoid secretat de corticosuprarenală. În cazul unor concentrații scăzute de sodiu, se intensifică reabsorbția lui tubulară, iar în cazul unor concentrații mari — eliminarea lui.

Conținutul total în K^+, la omul adult, este de 4 000 *mE* dintre care numai 70 *mE* sînt prezenți în fluidul extracelular. Menținerea concentrației în ioni de K^+ din ser, în limite normale, prezintă o deosebită importanță. La concentrații serice mai mari de 6 *mE*/l apar modificări ale electrocardiogramelor, la concentrații mai mari simptomele devin mai severe, pentru ca la 10 *mE*/litru inima intră în stop diastolic. Cazuri de hipokalemii apar în stări letargice, anorexii, paralizii periferice, modificări degenerative ale miocardului. Mecanismul renal de control homeostatic al concentrației ionilor de K^+ din serul sanguin este eficient numai în stări de hiperkalemii, cînd apare o excreție crescută a acestor cationi prin urină, cînd se înregistrează pierderi a unor fluide care conțin cantități mari de K^+ (sucul gastric — 40 mE/l; sucuri intestinale — 10 mE/l). Clinic deficiențele în K^+ se întîlnesc mai frecvent decît hiperkalemiile (tratamente de deshidratare, caşexii etc).

Hormonul somatotrop introdus în organism determină un bilanț pozitiv al sodiului și potasiului și induce mărirea volumului fluidului extracelular. STH sporește și transportul transmembranar al potasiului. Administrarea de *hormon adrenocorticotrop*, la om, este însoțită de retenția sodiului, clorului și apei în organism, de o creștere a *glicemiei* și toleranței față de glucoză la diabetici, de o excreție mărită de acid uric, azot, potasiu, fosfor. *Vasopresina* intervine în reglarea diurezei, intensificînd sau micșorînd reabsorbția apei în partea distală a tubilor contorți, acționînd direct asupra permeabilității membranelor celulare din tubulii renali. La alte animale, de exemplu, la amfibieni, vasopresina influențează și permeabilitatea pielii și vezicii urinare față pe apă și de ionii de sodiu. Un alt hormon, *insulina* influențează acumularea potasiului în celulă, concomitent cu retenția apei.

22.4.2 Calciu și Fosforul

Calciu se găsește în organismele vii atît sub formă de săruri solide cît și în soluție — în stare ionizată sau neionizată. La om și la organismele animale, acest element se găsește în special în țesutul osos, contribuind la realizarea funcției biologice a acestuia. În substanța osoasă, calciu se găsește sub forma unor apatite, săruri complexe cu calciu ca atom central. Cationul complex, realizat prin legături coordinative, leagă anionii HO^-, CO_3^{2-}, HPO_4^{2-} care sînt fixați labil și pot fi ușor înlocuiți prin reacții de schimb ionic. Prin metode de schimb izotopic s-a constatat că deși apatita este un produs cu o solubilitate extrem de redusă, există un schimb permanent între ionii de calciu și ionii fosfat din structura ei cu ionii corespunzători din sînge. În soluție, calciu poate exista fie într-o stare difuzabilă (ioni de Ca^{2+}) sau sub forma unor săruri neionizate cu mase moleculare mici, fie într-o stare nedifuzabilă cînd este integrat în complecși metaloproteici. Calciu sanguin apare fie ca ion liber, fie legat de proteide — ultima formă fiind și forma sub care circulă.

În afara rolului plastic, calciu îndeplinește sau participă la realizarea a numeroase fenomene fiziologice: este implicat în procesele de excitabilitate nervoasă și hormonală, în formarea cheagului din lapte, în coagularea sîngelui etc. Participarea ionilor de Ca^{2+} în mecanismul de coagulare a sîngelui poate fi demonstrată ușor prin faptul că principalii agenți anticoagulanți sînt *oxalatul*, *fluorura*, *citratul*, *EDTA* — agenți care complexează acest cation bivalent. Acest element mineral poate face parte integrantă din structura unor enzime (α-amilaza din diferite surse biologice), realizînd actul catalitic sau poate activa capacitatea catalitică a altor enzime (tripsina).

Calciu provenit din hrană se absoarbe în organism prin două mecanisme: *mecanismul activ*, prin care este absorbit în porțiunea cu reacție alcalină a jejunului, contra unui gradient de concentrație și *mecanismul pasiv*, cînd sub influența HCl gastric, calciu alimentar este eliberat din sărurile prezente în hrană și sub formă ionizată este absorbit în primele segmente ale duodenului. Coeficientul de absorbție intestinală a calciului alimentar variază în limite foarte largi, de la 27% la 57% și este funcție de *p*H mediului intestinal, de conținutul Ca^{2+} în alimente, de prezența acizilor grași în alimente într-o cantitate mult mai mare decît cea normală, de insuficiența secreției sucului pancreatic sau de o insuficiență de secreții biliare. Intervențiile *parathormonului* în reglarea calcemiei sînt funcție de starea fiziologică a organismului, de aportul de calciu alimentar și de vîrsta animalului. Kalu, Nadgi-Georgopoulos, Sarr, Solomona și Foster (1974) în experiențe efectuate pe animale paratiroidectomizate au arătat că cea mai mare cantitate de calciu apare în urina animalelor mature — 67% din Ca^{2+} plasmatic, mult mai puțin în urina animalelor imature sexual — 8%, și numai 4% în cazul animalelor hrănite cu o dietă deficitară în calciu. Pe baza datelor experimentale obținute se poate formula concluzia că parathormonul menține nivelul Ca^{2+} în plasma sanguină prin stimularea eliberării Ca^{2+} din oase, prin reabsorbția lui la nivelul matricei osoase și a rinichiului. Resorbția calciului la nivelul sistemului osos nu îndeplinește un rol major în reglarea

rapidă a concentrației calciului plasmatic decît în perioada cînd metabolismul calciului și deci al sistemului osos este foarte intens, adică în timpul creșterii. Procesul de absorbție intestinală a calciului exogen este îngreuiat de prezența oxalaților și fitinei și este activat de citrat și de vitamina *D*.

Menținerea constantă a concentrației calciului în fluidul intracelular este o problemă esențială pentru organismul viu. La nevertebrate, concentrația calciului este reglată cu ajutorul *tirocalcitoninei* și vitaminei D_3, deoarece potrivit cunoștințelor actuale hormonul paratiroidian apare pentru prima dată la amfibieni, deci odată cu trecerea de la viața acvatică la cea terestră. S t u d i t s k y (1945) interpretează apariția acestui hormon drept un mecanism suplimentar de reglare a calciului intern, în timp ce W i l l s (1970) îl consideră implicat numai în procesul de menținere a homeostaziei acido-bazice apărut tot în cursul trecerii animalelor acvatice la viața terestră. În capitolul 18 este redată schematic conlucrarea factorilor care participă la menținerea calcemiei și la reglarea proceselor Ca^{2+}-dependente. Controlul calciului prin intermediul derivaților hidroxilați ai vitaminei D_3 a fost studiat de școala lui D e L u c a (1968—1973) care consideră că acești compuși-hormoni sînt sintetizați de către rinichi.

Cercetarea atentă a lucrărilor publicate despre modul de acțiune a parathormonului arată că răspunsul calcemiei sub influența lui este lent, de durată (aproximativ 14—16 ore) de unde se desprinde ideea că hormonul reglează homeostazia Ca^{2+} nu oră de oră, ci zi de zi. Reglajul fin al calcemiei ar fi efectul „tamponării" fluidului extracelular prin schimbul ionilor de Ca^{2+} și PO_4^{3-} pe suprafața hidratată a cristalului de *hidroxilapatită*. Prin prisma evoluției viețuitoarelor această ipoteză pare plauzibilă deoarece fluidul extracelular și sistemele tampon ale organismului au apărut și s-au dezvoltat mult mai devreme decît glandele paratiroidiene. Pînă la apariția acestora, metabolismul Ca^{2+} a fost și este, probabil, controlat de derivații biologic activi ai vitaminei D_3 și de *tirocalcitonină*. Interesante sînt, în acest sens, experiențele efectuate de M a t h i e u, G u i s i n i e r-G l e i z e s, T h o m a s s e t (1974) în cazul unei nefrectomii bilaterale practicate pe șobolani, care provoacă aproape instantaneu o hipercalcemie de scurtă durată. Această hipercalcemie temporară poate fi anulată dacă animalelor nu li se administrează vitamină *D* sau li se îndepărtează glandele paratiroide. Autorii presupun că fenomenul se datorește unui factor endocrin, probabil *1,25-dihidroxicolecalciferolului*, deoarece în cazul ligaturării uretrelor fenomenele menționate nu mai au loc.

Prin urmare *metabolismul calciului este reglat de parathoromon* și de *calcitononina tiroidiană*, primul stimulînd demineralizarea țesutului osos (provoacă creșterea calcemiei), cel de-al doilea realizînd depunerea calciului în oase (provoacă scăderea calcemiei) printr-un mecanism de feedback, în care concentrația calciului în sînge este „senzorul" care dirijează secreția celor doi hormoni.

Efectul hipocalcemic al glucagonului a fost semnalat la diferite specii, de către mulți autori, dar mecanismul de acțiune nu a fost elucidat. Se pare că *hipocalcemia*, după administrare de glucagon este secundară unei stimulări a eliminării pe cale urinară a Ca^{2+}. G o z a r i u și a l ț i i (1972) au demonstrat în experiențe realizate „in vitro" și „in vivo" că *glucagonul*

are o acțiune hipocalcemiantă independentă de secreția de calcitonină și apreciază că acest efect se produce cu participarea sistemului osos.

Metabolismul anionului fosfat este într-o corelație strînsă cu metabolismul cationilor bivalenți Mg^{2+} și Ca^{2+}. Organismele animale iau acest anion din fosfați, esteri fosforici, fosfoproteide și-l depozitează în special în țesutul osos.

Fosfatul se găsește în principal sub formă de esteri organici forme activate a unor metaboliți. El joacă un rol important în stocarea energiei chimice la nivelul legăturilor macroergice ale *ATP*. Aportul fosforului din hrană, împreună cu cantitățile diferiților lui compuși anorganici și organici care sînt biosintetizați de organism crează un *fond metabolic comun* care depășește consumul acestuia. Absorbția fosfatului se face la nivelul duodenului, în 100 ml plasmă sanguină decelîndu-se 2—5 mg ortofosfat. Eliminarea se face pe cale renală sub controlul parathormonului, care inhibă reabsorbția fosfatului la nivelul tubulilor renali.

22.4.3 Magneziu

Magneziu este un microelement esențial pentru metabolismul celulei vii, fiind legat în structurile fosfaților din constituția scheletului (este antagonist calciului în procesul de osificare) și fiind implicat într-o serie de transformări care necesită ATP.

Magneziu este un element indispensabil, dar necesitățile zilnice nu se cunosc. Factorii care influențează absorbția Ca^{2+}, acționează și asupra Mg^{2+}, deși se pare că apariția unor maladii ereditare manifestate prin lipsa capacității de absorbție a Mg^{2+} indică un mecanism special de absorbție. După administrare, cantitățile de Mg^{2+} neabsorbite sînt rapid excretate în urină și fecale.

Concentrația acestui microelement în serul sanguin normal este de 1,8—2,5 *mE*/l, dintre care aproximativ 80% se află într-o stare ionizată și difuzibilă. Eritrocitele conțin 3,5 *mE*/l, iar țesuturile — aproximativ 16 *mE*/l.

La ciini și șobolani, lipsa magneziului din hrană este însoțită de vasodilatații, aritmie cardiacă, hiperiritabilitate, convulsii — simptome care duc în final la moartea animalului.

La om, pierderi masive în Mg^{2+} apar în diaree, administrare de diuretice fără asociere cu administrarea magneziului, paratiroidectomie, alcoolism, insuficiență renală cronică etc. Cînd concentrația serică în Mg^{2+} scade la 1 *mE*/l, apare un sindrom care amintește de *delirium tremens*: semicomă, spasm carpopedal, iritabilitate neuromusculară cu susceptibilitate crescută la stimuli auditivi, mecanici și vizuali.

Acest microelement intră în constituția unor enzime, luînd parte la actul catalitic sau exacerbează capacitatea catalitică a altora. În cazul *pirofosfatazei anorganice*, ionii de Mg^{2+} activează enzima formînd un chelat cu substratul și stabilind legături coordinative cu enzima în cadrul complexului enzimă-substrat. *Enolaza* din drojdie este o magneziu-enzimă formată din două subunități inactive din punct de vedere catalitic, de

aproximativ 34 000 daltoni fiecare. Ionul metalic se combină întîi cu o subunitate protetică, produce modificări ce au ca rezultat creşterea afinităţii acestei subunităţi pentru cea de a doua subunitate.

22.4.4 Fierul

Fierul se găseşte *în structura unui număr impresionant de metaloproteide*. Dintre fier-enzime, amintim fier-flavinenzimele *(xantin oxidaza, aldehid oxidaza, NADH dehidrogenaza* şi *succinat dehidrogenaza)*, fier-hemo-enzime *(catalaza, peroxidaza* şi *citocromii)*, dioxigenazele *(catecol-2,3-dioxigenaza, catecol-1,2-dioxigenaza* şi *protocatecuat-3,4-dioxigenaza)* etc. Toate fier-flavin-enzimele sînt dehidrogenaze care acţionează asupra unei mari varietăţi de acceptori de hidrogen, metalul fiind necesar numai pentru reducerea unui anumit tip de acceptori. În catalază, peroxidază — acceptorii sînt compuşii peroxidici, gruparea prostetică fiind hemul în care fierul este legat covalent şi coordinativ. Feredoxinele sînt fier-enzime nehemice care acţionează ca purtători de electroni într-o mare varietate de reacţii care sînt implicate în procesele de fixarea azotului la bacterii (v. cap. 8).

Aproximativ 25% din cantitatea totală de fier este stocată în ficat, splină şi oase. Proteinele de depozitare a fierului sînt *feritina* şi *homosiderina*, ultima conţinînd 35% fier sub forma unui gel de $Fe(OH)_3$. În plasma sanguină, fierul se găseşte în structura unei transferine, *siderofilina* — care reprezintă şi forma de transport a acestui microelement (v. cap. 7).

Conţinutul organismului în fier este de 2—4 g. O dietă deficitară în acest element dă naştere unei anemii hipocrome. Organismele vii conservă cu mare eficienţă acest element, pierderi masive avînd loc în hemoragii.

22.4.5 Sulful

Este un *component al aminoacizilor — cisteina şi metionina, al peptidelor, polipeptidelor şi proteinelor* care conţin resturi din aceşti aminoacizi, al coenzimei *A*, a *vitaminelor — tiamina şi biotina* etc. Sub forma unor esteri organici ai acidului sulfuric, sulful intră în constituţia hipopolimerilor ţesutului conjunctiv, a glicolipidelor şi a acizilor biliari conjugaţi.

22.4.6 Cupru

Necesitatea zilnică în *cupru*, la copii de 7—17 zile variază între 50—100 μg/kg corp/24 ore, la copii de 6—10 ani —80, iar la adulţi de 30 (♀) şi 40 (♂) μg/kg corp/24 ore. Surse bune de cupru, pentru om, sînt ficatul ovinelor, scoicile, peştele şi legumele verzi. Accesibilitatea cuprului este influenţată de sulfiţii endogeni şi exogeni (ingeraţi odată cu hrana), precum şi de cadmiu, care în concentraţii de 3 μg/g hrană scade capacitatea organismului de a utiliza cupru.

Insuficiența în cupru, este întîlnită la copii hrăniți numai cu lapte și se manifestă prin încetinirea creșterii, anorexie față de hrana solidă, o excitabilitate crescută, oedeme periorbitale etc. La copii mici, în perioada de alăptare la sîn, boala cunoscută sub denumirea *sindrom* Menkes este condiționată genetic de un defect de absorbție a cuprului. Sindromul Menkes se caracterizează prin înapoierea mintală progresivă, dereglarea procesului de keratinizare a părului, hipotermie, modificări degenerative ale elastinei aortei însoțite de un conținut scăzut al acestui microelement în plasma sanguină și în ficat.

Deficiența în cupru, la șobolani, apare în cazurile proastei absorbții a fierului alimentar, simptomele dispărînd în urma administrării parentale a fierului. Aceste animale au concentrații mici de citocrom *c* hepatic, citocromoxidază și o capacitate crescută a plasmei de a lega fierul. Deficiența cronică în cupru conduce la un anoestrus în femelele șobolanilor. Arterele porcilor cu deficiență în cupru sînt fragile datorită incapacității de-a face desmozină și isodesmozină, deci de a realiza structura înrețelată a elastinei. Depozitarea excesivă, în țesuturi, a cuprului se numește *boala Wilson*, o degenerare hepatolenticulară, caracterizată chimic de o deficiență în ceruloplasmină, globulina care leagă cupru.

Cupru este un microelement constitutiv al enzimelor tirozinaza, uratoxidaza, dopamin-β-hidroxilaza, aminooxidazele, citocromoxidaza. Superoxiddismutaza citoplasmatică conține Cu^{2+} și Sn^{2+}.

22.4.7 Zinc

Produsele alimentare de origine animală sînt principalele surse de zinc pentru om (carnea animalelor domestice cornute conține 20—60 μg/g, laptele — 3—5 μg/g, produsele de origine marină sau oceanică — 15 μg/g etc.). Alimentele de origine vegetală sînt, de regulă, surse mediocre de zinc, iar cele ce conțin și fitină influențează negativ absorbția zincului. Zincul din alimente se absoarbe relativ greu și concentrația lui în sînge atinge un maximum (150 μg/100 ml) numai după șase săptămîni de la ingerarea unei doze zilnice de 600 mg $ZnSO_4 . 7H_2O$ (Abdulla și Nordem, 1974). În mod normal, concentrația zincului în plasmă este în medie de 170—180 μg %, variind între 100—370 μg %, dar în unele stări patologice (ulcer, *sindromul* Fanconi, *sindromul* Turner etc.) poate să scadă la 45—65 μg %. O diminuare a concentrației de zinc plasmatic a fost observată în *anemia falciformă*. Acest element mineral este răspîndit neuniform în diferite organe, țesuturi și fluide biologice (os — 200 μg/g; mușchi 50 μg/g; eritrocite 12—14 μg/ml etc.) *nu circulă de la un organ la altul, din care cauză aportul zilnic este strict necesar.* Este eliminat în principal prin fecale și numai în cantități mici prin urină și transpirație.

Zincul intră în structura multor proteine cu funcții biologice esențiale, participînd la stabilizarea structurilor tridimensionale, sau luînd parte efectivă la procese catalitice. Intră în structura hormonului pancreatic insulina și în structura unui număr însemnat de enzime. Carbonic anhidraza este o metaloenzimă care catalizează hidratarea reversibilă a dioxi-

dului de carbon, are o masă moleculară de 30 000 — cînd este izolată din eritrocite — și conține un atom de zinc per mol de proteină, absolut necesar pentru activitatea catalitică. În procarboxipeptidaza *A*, un zimogen izolat din pancreasul bovin, zincul are un rol complex, pe de o parte de stabilizare a structurii cuaternare a zimogenului, de participare efectivă la procesul de activare, iar pe de altă parte de stabilizare a structurii tridimensionale a enzimei active și a configurației spațiale a centrului activ, luînd efectiv parte la actul catalitic. *Alcool dehidrogenaza* din drojdia de bere are o masă moleculară de 151 000, conținînd patru atomi de zinc per moleculă și leagă patru molecule de NAD^+. Îndepărtarea atomului de zinc provoacă o inactivare însoțită și de o disociere a proteinei în subunități, ceea ce indică *un rol dublu al metalului: structural și funcțional.*

La șobolani, deficiența în zinc se manifestă prin încetinirea creșterii, alopecie, leziuni la nivelul pielii, esofagului și corneei. Carența în zinc *la om* este însoțită de *încetinirea creșterii, infantilism sexual la adolescenți, scăderea sensibilității gustative și scăderea acuității auditive, perturbarea procesului de vindecare a rănilor.* La om, deficiența în zinc a fost asociată cu deficiența în calciu și fier și a fost semnalată în Egipt, Iran, la populația care se hrănește cu cereale bogate în acid fitic — metabolit care împiedică absorbția intestinală a sărurilor de zinc.

Se presupune că acest element este absorbit mult mai lent și în cantități insuficiente în prezența fitinei, hemicelulozei și complecșilor unor aminoacizi cu glucide. După unele date difuzate de Organizația Mondială a Sănătății, numai 20—40% din zincul prezent în alimente este absorbit în ducden.

22.4.8 Mangan

Necesitățile precise pentru *mangan*, la om, n-au fost încă precizate. Sărurile de mangan sînt puțin absorbite din intestin, dar după administrare parenterală, acest element este *concentrat în ficat și rinichi* (mitocondrii) și *excretat în cantități mari prin colon și bilă.* Ingerarea unor cantități mari de mangan interferă cu procesul de absorbție a fierului, cauzînd anemii severe.

Carența în mangan la animalele de laborator, la păsări și la porci se manifestă prin ataxia noilor născuți, dereglarea proceselor de osificare, depresia funcției de reproducere, încetinirea creșterii.

La om, carența în mangan nu este cunoscută. Copiii mici, în perioada alăptării elimină prin fecale o cantitate de Mn de cinci ori mai mare decît doza pe care o primesc zilnic. Odată cu trecerea la alimentația normală necesitatea în mangan crește pînă la 150—200 μg/kg corp.

Intoxicația cu acest element este cunoscută la minierii din minele de mangan, principalele căi de pătrundere a acestui element fiind pulmonul și aparatul digestiv. *Boala cauzată de intoxicația cu mangan — locura manganica* — este caracterizată prin *grave tulburări ale sistemului nervos, mers anormal, dereglarea vorbirii* etc., *simptome care amintesc schizofrenia și boala Parkinson.*

Manganul este intim legat de structura arginazei hepatice și activează multe enzime: fosfoglucomutaza, colinesteraza, β-cetodecarboxilazele oxidative, anumite peptidaze și ATP-aza musculară.

22.4.9 Cobalt

Prezent în alimente în cantităţi ce variază de la 150 μg la 600 μg, este absorbit şi distribuit diferitelor ţesuturi. Participă la biosinteza vitaminei B_{12} în structura căreia există. Deficienţa în cobalt a fost observată numai la rumegătoare, reflectînd incapacitatea microorganismelor din rumen de a biosintetiza vitamina B_{12}. Administrarea unor cantităţi mici de cobalt, în scopuri curative, de exemplu, pentru stimularea procesului de eritropoieză la copii anemici sau la femeile gravide (25—30 mg/zi) conduce la apariţia unor fenomene toxice determinînd hiperplazia tiroidei, oedemuri, insuficienţă cardiacă etc.

22.4.10 Crom

Importanţa biologică prezintă numai *cromul trivalent*, care s-a dovedit că *activează insulina influenţînd astfel indirect glicemia*. Concentraţia Cr^{3+} în sînge este de 1 μg/l, iar în urină de 4—7 μg/l. Forma sub care se găseşte Cr^{3+} în alimente şi mecanismul absorbţiei lui în intestin nu sînt încă cunoscute.

Lipsa de Cr^{3+} *se concretizează prin dereglarea toleranţei organismului ată de administrarea per os sau intravenos a glucozei*, prin *scăderea concentraţiei de* Cr^{3+} *în sînge, urină şi îndeosebi în păr*. Carenţa de crom se poate întîlni la femeile gravide, bolnavii de diabet, la copiii care consumă cantităţi importante de proteine, la persoanele care ţin regimuri dietetice îndelungate etc.

Cr^{3+} administrat *per os* nu este toxic, în schimb administrat subcutan animalelor de laborator este letal în doze variabile (0,5/kg corp la iepuri pînă la 30 mg/kg corp la şoareci).

22.4.11 Molibden

Urme de molibden *sînt necesare pentru creşterea normală*. Rolul lui în nutriţia animală nu este clar. La ierbivore, ingerarea unor cantităţi mici de molibden are ca rezultat creşterea necesităţilor pentru cupru. *Deficienţa în molibden* are ca rezultat şi *scăderea activităţii xantinoxidazei hepatice şi intestinale*. Această enzimă, izolată din ficatul mamiferelor conţine patru atomi gram de fier, doi de molibden şi o moleculă de FAD. Prin spectroscopie RES s-au depistat semnale datorate unei flavin semichinone, Mo^{5+} şi Fe^{2+}. Se pare că reacţia de reducere este bifazică, mai întîi are loc formarea unei semichinone şi apoi a $FADH_2$. Molibdenul este probabil redus de la Mo^{6+} la Mo^{5+} şi în final la Mo^{4+}, deoarece prin reducere completă dispare semnalul RES. Se pare că şi Fe^{3+} este de asemenea redus.

22.4.12 Litiu

Administrarea sub formă de carbonat, în doze fiziologic normale are un efect inhibitor asupra hexokinazei, piruvat decarboxilazei și alanin aminotransferazei, influențînd astfel mersul unor importante reacții metabolice (K a d i s, 1974). *Litiu*, de asemenea, inhibă activitatea DNA-polimerazei Mg dependente, însă în concentrații mai mari decît cele folosite frecvent în clinică (L a z a r u s & K i t r o n, 1974). Mecanismul prin care litiu acționează asupra enzimelor Mg-dependente este bazat, după B i r c h (1974) pe similaritatea proprietăților lui fizice și chimice cu cele ale magneziului.

Litiul este capabil să inhibe activitatea DNA-polimerazei din citoplasma și din nucleul celulelor renale în proporție de 50% la o concentrație de numai 0,035 *M*, iar în condiții fiziologice normale, litiul *blochează sinteza DNA aproape* total (95%). Acest efect al litiului este unic și el nu poate fi deocamdată explicat decît indirect prin modificările pe care el le determină în activitatea adenilatciclazei și al transportului prin membrană de Na^+ și K^+ (L a z a r u s & K i t r o n, 1974).

S n y d e r (1977) a descris existența în creier și în măduva spinării a unor receptori pentru morfină și substanțe morfin-asemănătoare, care există în două forme conformaționale : o formă legată cu Na^+ cu o mare afinitate pentru antagoniștii morfinei și altă formă nelegată cu afinitate mare pentru morfină. Efectul sodiului este selectiv și numai litiul poate să-l reproducă.

22.4.13 Iod

Principala sursă de iod a organismului o constituie în cea mai mare parte *iodul alimentar* și într-o măsură mai mică — iodul prezent în apa de băut. Dintre alimente, *cele mai bogate în iod* sînt : *peștele marin și oceanic, salata, spanacul, pătrunjelul, morcovii, țelina, ceapa, nucile, alunele, arahidele, ceaiul* etc. Consumul cotidian de iod, sub formă de iodură, este de 270—320 μg și este în funcție de sex și de vîrstă. Atît iodul cît și unele forme oxidate ale iodului, prezente în alimente, sînt reduse cu formare de iodură în timpul digestiei la nivelul tractului gastro-intestinal, de unde sînt absorbite într-un interval relativ scurt. Iodura este transportată în plasma sanguină, de unde este ulterior repartizată în fluidele extracelulare și în diferite organe. Din iodul total aflat în organismul uman adult, 25—50 mg, jumătate se găsește în mușchi, 1/10 în piele, 1/17 în țesutul osos, 1/5 în glanda tiroidă (aproximativ 6 mg iod) ; glandele salivare și mamare, pineala, placenta conțin cantități neînsemnate. Cantitatea totală de iod prezentă în glanda tiroidă variază în limite foarte largi, de la 5 mg la 20 mg și este repartizat astfel, după forma în care se găsește : 10% iod anorganic și 90% iod organic sub formă de MIT (17—28%), DIT (24—42%), T_3 (5—8%), T_4 (20—28%). Raportat la cantitatea de iod depistată în *tiroglobulină* (90%), iodul neidentificat în lanțurile polipeptidice formează aproximativ 10%, iodtirozinele libere fiind consecința procesului de proteoliză. Două treimi din iodul absorbit la nivelul intesti-

nului sînt excretate prin rinichi, o treime fiind concentrată în glanda tiroidă. Captarea iodului de glanda tiroidă este stimulată de *hormonul tireotrop* al hipofizei și mecanismul concentrării ionilor I^- în tiroidă se face prin transport activ.

Transportul activ al iodurii prin membrana celulară pare a fi influențat pozitiv de fosfatidilcolina membranară și inhibat de ClO_3^-, SCN^-, NO_3^-, T_4 liber, iodtirozina și dinitrofluorofosfat. În general toate substanțele care inhibă respirația diminuează procesul de acumulare a iodului în glanda tiroidă.

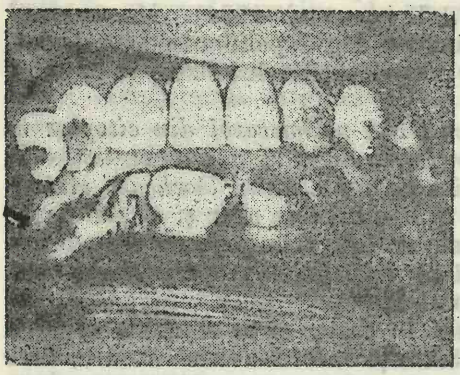


Fig. 22.2. — Demineralizarea danturii în cazul lipsei din alimentație a fluorului.

22.4.14 Fluor

Cercetări relativ recente au demonstrat că *prezența fluorurilor în apa de băut în concentrații care variază între* 0,6—1,2 mg/l *este absolut necesară pentru protecția danturii contra cariilor dentare.* Probabil, fluorul este implicat într-o modificare chimică a cristalelor de hidroxilapatită din emailul dentar, prin substituirea grupării hidroxil. Demineralizarea scheletului soldată cu osteoporoză și scăderea densității radiologice a oaselor a fost corelată în unele cazuri cu concentrații scăzute de fluor în apa de băut (fig. 22.2). Se pare că un anumit echilibru Ca-F este implicat în apariția acestor maladii terapia cu fluor reprezentînd o direcție de restabilire a acestui echilibru,

22.4.15 Seleniu

Fiind un analog al sulfului, *seleniu* îl poate substitui în diferiți compuși. Se pare că își manifestă activitatea biologică împreună cu tocoferolii în activitatea antioxidantă. Este un microelement absolut necesar pentru animalele de laborator; absența lui la păsări are drept consecință dereglarea creșterii, degenerarea fibroasă a pancreasului, penaj sărăcăcios, în timp ce la șobolani se constată încetinirea creșterii și dezvoltării blănii, dereglarea funcției de reproducere însoțită de o morfologie anormală a spermatozoizilor. La primatele înrudite cu omul, lipsa seleniului din alimentație conduce la necroza ficatului, nefroză și la modificări degenerative ale miocardului și musculaturii striate. Animalele domestice suferă, de asemenea, în carența de seleniu, carnea și produsele lor depreciindu-se simțitor.

Sursele de seleniu, pentru organismele animale și pentru om sînt: *apa* (80—100 μg/l), *produsele alimentare de origine animală* (0,2 mg/kg masă umedă), *fructele și legumele* (0,010 mg/kg masă umedă). Cantitatea de seleniu necesară pentru acoperirea necesităților organismelor animale

este în funcție de conținutul vitaminelor *E* din alimente. În cantități mari, seleniu este toxic și această acțiune este anihilată de proteinele alimentare și de compușii As și S.

22.5 ECHILIBRUL ACIDO-BAZIC

Menținerea constantă a pH fiziologic din celulă și din fluidele extracelulare este datorată sistemelor tampon care-și fac manifestată acțiunea la nivelul plămînilor, rinichilor și sîngelui. Există *trei sisteme tampon principale: sistemul tampon pe bază de fosfați; sistemul tampon bicarbonat; sistemul tampon realizat de hemoglobină.*

În constituția unui sistem tampon intră sarea unui acid slab, și acidul HA care ionizează după ecuația:

$$HA \rightleftharpoons H^+ + A^-$$

Acidul are o constantă de aciditate:

$$K_a = \frac{[H^+] \cdot [A^-]}{[HA]} \qquad (1)$$

Prin logaritmarea zecimală a ecuației (1) se obține binecunoscuta relație Henderson-Hasselbalch:

$$pH = pK_a + lg \frac{[A^-]}{[HA]} \qquad (2)$$

În cazul titrării acidului slab HA cu o bază tare, concentrația bazei conjugate A^- crește proporțional cu cantitatea de bază adăugată și deci cu cantitatea de sare formată. Prin urmare ecuația (2) se poate generaliza:

$$pH = pK_a + lg \frac{[sare]}{[acid]} \qquad (3)$$

În cazul primului sistem tampon, acidul slab H_3PO_4 prezintă următoarele trepte de ionizare:

$$H_3PO_4 \underset{\nearrow}{\overset{H^+}{\rightleftharpoons}} H_2PO_4^- \underset{\nearrow}{\overset{H^+}{\rightleftharpoons}} HPO_4^{2-} \underset{\nearrow}{\overset{H^+}{\rightleftharpoons}} PO_4^{3-}$$

pK_a ..... 2,1 ..... 6,7 12,3

perechea activă în sistemul tampon fiind $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$, pentru care ecuația Henderson-Hasselbalch este:

$$pH = 6{,}7 + lg \frac{[HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^-]} \qquad (4)$$

La valoarea pH fiziologic normal, înlocuind în ecuația (4), pH = 7,4 se obține valoarea raportului $[HPO_4^{2-}]/[H_2PO_4^-] = 5{,}1$, (5) care ne arată că concentrația formei acide $H_2PO_4^-$ este de cinci ori mai mică decît concentrația formei sare HPO_4^{2-}, ceea ce denotă o bună capacitate de tamponare, în special pentru cantitățile suplimentare de acid. O dietă medie, în fiecare zi-normală, conduce la obținerea unor cantități mai mari de acid decît de bază.

Principalul sistem tampon extracelular este HCO_3^-/H_2CO_3 deoarece:

— concentrația anionului bicarbonat este foarte mare;

— există mecanisme fiziologice care operează pentru menținerea pH extracelular, fie controlînd concentrația HCO_3^-, fie concentrația CO_2;

— sistemul tampon bicarbonat funcționează cuplat cu hemoglobina.

Ca și în celelalte sisteme tampon, pH nu este dependent de concentrațiile absolute ale constituenților sistemului tampon ci de raportul lor, după cum stabilește ecuația H e n d e r s o n-H a s s e l b a l c h. Deoarece concentrația H_2CO_3 este dată numai de presiunea CO_2 alveolară și nu este afectată de adiția unor acizi sau baze, acest sistem este deosebit de eficient în menținerea pH fiziologic normal. Eficiența acestui sistem tampon este mult mărită de prezența eritrocitelor.

Reacțiile de disociere sînt:

$$H_2CO_3 \underset{}{\overset{H^+}{\rightleftharpoons}} HCO_3^- \overset{H^+}{\rightleftharpoons} CO_3^{2-}$$

$$pK_a \text{ ..... } 3{,}77 \text{ ..... } 10{,}2$$

De fapt se stabilesc următoarele echilibre:

$$CO_{2_{(gazos)}} \rightleftharpoons CO_{2_{(dizolvat)}}$$

$$CO_{2_{(dizolvat)}} + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3 \qquad (5)$$

$$H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$$

Reacția globală este:

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^- \qquad (6)$$

și are loc sub acțiunea catalitică a enzimei carbonic anhidraza.

Concentrația CO_2 totală este egală cu concentrația anionului bicarbonat, la care se adaugă concentrația gazului dizolvat și concentrația acidului carbonic nedisociat:

$$[CO_{2_{total}}] = [HCO_3^-] + [CO_{2_{dizolvat}}] + [H_2CO_3] \qquad (7)$$

sau

$$[CO_{2_{dizolvat}}] + [H_2CO_3] = [CO_{2_{total}}] - [HCO_3^-] \qquad (7')$$

Valoarea constantei de aciditate pentru reacția globală (6) va fi dată de relația:

$$K_a = \frac{[H^+] \cdot [HCO_3^-]}{[CO_2]}, \qquad (8)$$

și ecuația Henderson-Hasselbalch:

$$pH = 6{,}1 + \lg \frac{[HCO_3^-]}{[CO_{2_{total}}] - [HCO_3^-]} \quad (9)$$

deoarece valoarea de 6,1 reprezintă exponentul de aciditate mediu al reacției de ionizare a acidului carbonic, iar concentrația formei acide este egală cu $[CO_{2_{dizolvat}}] + [H_2CO_3]$, sau, conform ecuației 7', cu $[CO_{2_{total}}] - [HCO^-]$.

Termenul $[CO_{2_{total}}]$ dintr-o probă de plasmă se determină experimental prin măsurarea volumului de CO_2 eliberat prin acidifiere cu un acid mineral tare. Termenul $[HCO_3^-]$ poate fi determinat din ecuația (9), substituind valoarea *p*H fiziologic — 7,4.

Ținînd seama că concentrația unui gaz într-o fază lichidă este proporțională cu presiunea parțială a acestuia și coeficientul de solubilitate se poate calcula concentrația CO_2 exprimată în milimoli la o presiune parțială a gazului de 1 mm Hg. Se știe că la 38°C și 760 mm Hg, 1 ml de plasmă conține 0,51 ml CO_2, 1 milimol din orice gaz real ocupă un volum de 22,26 ml, se poate calcula concentrația CO_2 exprimată în milimoli din 100 ml plasmă, la o tensiune parțială de 1 mm Hg:

$$\frac{0{,}51}{760 \cdot 22{,}26} \cdot 1\,000 = 0{,}0301 \text{ milimoli } CO_2.$$

Efectuînd înlocuirile propuse, ecuația (9) devine:

$$7{,}4 = 6{,}1 + \lg \frac{[HCO_3^-]}{0{,}0301 \cdot P_{CO_2}},$$

unde P_{CO_2} este presiunea parțială a CO_2. Valoarea raportului,

$$\frac{[HCO_3^-]}{0{,}0301 \cdot P_{CO_2}} = \frac{[HCO_3^-]}{CO_{2_{dizolvat}}} = 20,$$

egală cu 20 este o caracteristică a plasmei sanguine, la *p*H 7,4.

Un raport de 19,05 — caracteristic sîngelui venos — indică un *p*H mai acid (7,38), concentrația HCO_3^- fiind cu 1,1 mM mai mare decît concentrația formei acide din sîngele arterial.

Tensiunea parțială a CO_2 din sînge este funcție de viteza și intensitatea ventilației pulmonare. În cazul unei hipoventilații pulmonare are loc o scădere a difuziei CO_2 din sînge spre alveolele pulmonare, deci o creștere a tensiunii parțiale a acestui gaz în plasma sanguină, în ultimă instanță fiind soldată cu o creștere a acidității sîngelui. În cazul hiperventilației pulmnoare, cînd are loc trecerea rapidă a CO_2 din sînge în alveole, se constată o creștere a *p*H sanguin, deci o ușoară alcalinizare a sîngelui. În cele două situații opuse, modificările de *p*H sînt relativ mici:

7,29	7,4	7,58
Hipoventilație	*Normal*	*Hiperventilație*

Prin aceste mecanisme se realizează *controlul respirator* al *p*H sanguin.

Spre deosebire de concentrația HCO_3^-, concentrația H_2CO_3 este determinată numai de tensiunea parțială a CO_2 din amestecul gazos în echilibru cu fluidul extracelular, aerul alveolar. Aceasta este dependentă de viteza cu care CO_2 părăsește sîngele pulmonar diluîndu-se cu aerul atmosferic și deci cu profunzimea respirației. Acestea sînt reglate de sistemul nervos la nivelul centrului respirator, sensibil la *p*H și P_{CO_2} a fluidului extracelular.

Cînd *p*H fluidului extracelular scade sub valoarea normală, datorită diminuării concentrației anionului HCO_3^-, respirația este stimulată, scăzînd P_{CO_2} alveolară și deci concentrația H_2CO_3 extracelulară. Aceasta tinde să refacă raportul $[HCO_3^-]/[H_2CO_3]$ la valoarea 20 și astfel să readucă *p*H la valoarea de 7,4. Scăderea presiunii gazului din plasmă afectează celulele nervoase într-o manieră diferită și compensarea nu poate fi completă dacă acesta este singurul mecanism de reglare.

La un *p*H plasmatic mare, ritmul accelerat al respirației determină scăderea P_{CO_2} alveolară și deci $[H_2CO_3]$ plasmatic crește, *p*H deplasîndu-se către valoarea 7,4. Din nou, o perfectă compensație nu poate fi realizată deoarece $[H_2CO_3]$ plasmatic crescută are un efect opus asupra centrului respirator. Dacă ritmul respirației scade suficient, P_{O_2} diminuată poate fi un stimul al activității respiratorii crescute. Compensația pulmonară este extrem de rapidă dar niciodată completă, în contrast cu compensarea renală care necesită o perioadă mai îndelungată, dar care realizează restaurarea completă a *p*H.

La nivelul alveolelor pulmonare, tensiunile parțiale a celor două gaze implicate în procesele respiratorii sînt: $P_{O_2} = 107$ mm Hg și $P_{CO_2} = 36$ mm Hg, care permit saturarea 100 % a hemoglobinei cu oxigen, cînd se formează *oxihemoglobina*, formă sub care hemoglobina este vehiculată de sînge spre țesuturile periferice (în care presiunea parțială a CO_2 este mult mai mare decît cea a O_2) unde cedează oxigenul necesar la acest nivel pentru oxidările celulare, și acceptă, datorită presiunii parțiale mari — CO_2. Afinitatea hemoglobinei pentru oxigen este redusă de prezența metabolitului eritrocitar 2,3-difosfo-*D*-gliceratul și de valorile acide ale *p*H sanguin (așa-numitul *efect* B o h r). Prin urmare încărcarea sîngelui, la nivelul țesuturilor periferice cu CO_2 are ca rezultat scăderea *p*H sanguin, fenomen care induce scoaterea de noi cantități de O_2 prin complexul oxihemoglobinei.

Transportul CO_2 de la țesuturile periferice spre alveolele pulmonare, unde are loc procesul expirației, se realizează prin două modalități: 20 % sub formă de *carbaminohemoglobină* și 80 % printr-un mecanism de *transport izohidric*. În primul caz, dioxidul de carbon produs de catabolismul celular, se leagă covalent cu un rest de valină, de la capătul N-terminal al subunităților hemoglobinei, printr-o reacție reversibilă:

$$Hb{-}NH_2 + CO_2 \rightleftharpoons Hb{-}NH{-}COO^- + H^+$$

care permite cedarea lui la nivelul plămînilor. Transportul izohidric este realizat fără modificări de *p*H, datorită capacității de tamponare a hemoglobinei. Oxihemoglobina este un acid mai puternic (pK_a — 7,16) decît deoxihemoglobina (pK_a — 7,71) și cedează O_2 după ecuația:

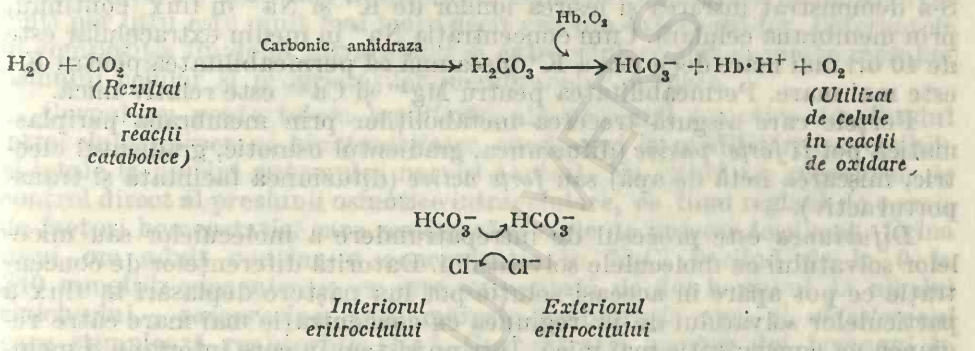
$$Hb \cdot O_2 + n.H^+ \rightleftharpoons Hb \cdot H_n^+ + O_2$$

în care protonii provin din reacția de disociere a acidului carbonic format din CO_2 care difuzează din țesuturi în plasma sanguină :

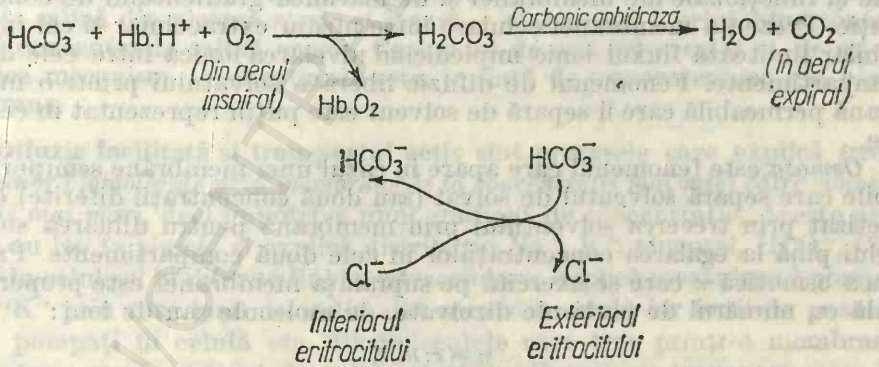
$$H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$$

Anionul bicarbonat este apoi transportat prin intermediul sîngelui venos spre plămîni, unde hemoglobina (protonul necesar refacerii acidului carbonic, care sub acțiunea catalitică a carbonic anhidrazei) eliberează CO_2, expirat prin plămîni. O altă cantitate de protoni, care ia parte la aceste reacții este cea rezultată la formarea carbaminohemoglobinei.

Transportul izohidric al CO_2 necesită contradifuzia anionilor Cl^- și HCO_3^-, la nivelul membranei eritrocitare, pentru menținerea electroneutralității. Astfel, ieșirea anionului HCO_3^- din interiorul eritrocitului dintr-un capilar tisular este contrabalansată de intrarea anionului Cl^-, iar intrarea HCO_3^- prin membrana unui eritrocit dintr-un capilar pulmonar este echilibrată de ieșirea Cl^-. Reacțiile care au loc pot fi schematizate astfel :



Reacțiile care au loc într-un eritrocit dintr-un capilar tisular



Reacțiile ce au loc într-un eritrocit dintr-un capilar pulmonar.

Această situație este reflectată de observația experimentală că $[Cl^-]$ este mai mare și $[HCO_3^-]$ este mai mică în sîngele arterial decît în cel venos.

Echilibrul acido-bazic este reglat nu numai la nivelul plămînilor și sîngelui ci și pe cale renală, prin eliminarea selectivă și reabsorbția ionilor

nevolatili la nivelul membranelor celulare ale nefronilor. *Rinichiul realizează importante procese de menținere a homeostaziei, raportată la compoziția și concentrația electroliților.*

Organismele vii prezintă un adevărat echilibru hidric între aportul de apă și eliminarea ei în mediu exterior. Apa pătrunde în organism odată cu alimentele — la organismele animale și la om, sau prin absorbție radiculară — la organismele vegetale. La acest aport de apă se adaugă apa rezultată în urma respirației celulare, din procesele de oxido-reducere. Eliminările de apă se realizează, de exemplu la om prin urină, fecale, respirație, transpirație etc. Reglarea acestui echilibru hidric se realizează prin senzația de sete sau pe cale renală — sub controlul riguros al hormonului hipofizar, vasopresina.

Permeabilitatea membranei periplasmatice este strîns legată de activitatea metabolică a întregii celule, fiind selectivă și dinamică, variind dintr-un moment într-altul pentru același metabolit, în funcție de necesitățile celulei. Apa trece prin celulele epiteliale împreună cu electroliții. S-a demonstrat intrarea și ieșirea ionilor de K^+ și Na^+ în flux continuu, prin membrana celulară. Cum concentrația Na^+ în mediu extracelular este de 40 ori mai mare decît cea a K^+ înseamnă că permeabilitatea pentru K^+ este mai mare. Permeabilitatea pentru Mg^{2+} și Ca^{2+} este relativ mică.

Forțele care aisgură trecerea metaboliților prin membrana periplasmatică pot fi *forțe pasive* (difuziunea, gradientul osmotic, gradientul electric, mișcarea netă de apă) sau *forțe active* (difuziunea facilitată și transportul activ).

Difuziunea este procesul de întrepătrundere a moleculelor sau micelelor solvatului cu moleculele solventului. Datorită diferențelor de concentrație ce pot apare în aceeași soluție pot lua naștere deplasări în flux a particulelor solvatului de la regiunea cu concentrație mai mare către regiunea cu concentrație mai mică. Într-un sistem în care intervine o membrană, procesul de difuzie este diferit, depinzînd de proprietățile structurale și funcționale ale membranei și de mărimea gradientului de concentrație. Prezența membranei celulare între mediu extracelular și cel intracelular limitează fluxul ionic împiedicînd nivelarea ionică între cele două compartimente. Fenomenul de difuzie liberă a solvatului printr-o membrană permeabilă care îl separă de solvent este puțin reprezentat în celula vie.

Osmoza este fenomenul care apare în cazul unei membrane semipermeabile care separă solventul de solvat (sau două concentrații diferite) concretizat prin trecerea solventului prin membrană pentru diluarea solvatului pînă la egalarea concentrațiilor în cele două compartimente. Presiunea osmotică π care se exercită pe suprafața membranei este proporțională cu numărul de particule dizolvate, de molecule sau de ioni:

$$\pi = c.R.T,$$

unde:

c este concentrația; R — constanta universală 0,082 litri-atm./mol/grad; T — temperatura absolută, exprimată în grade *Kelvin*.

Datorită fenomenelor de osmoză au loc deplasări ale apei și biomoleculelor cu masă moleculară mică de-a lungul diferitelor sisteme membranare. De exemplu, dacă în spațiul interstițial a pătruns o cantitate mare de

electroliți, celulele pierd o parte din apa lor, sub acțiunea osmozei, conducînd la egalarea concentrațiilor. Acest lucru este valabil în cazul membranelor semipermeabile care permit trecerea apei, dar nu și a solvaților. În organism, în cazul în care difuzia nu poate avea loc iau naștere diferențe de presiuni osmotice. Componentele intracelulare ale unei celule au o anumită osmolaritate. Soluțiile cu presiune osmotică egală se numesc *soluții izotonice*. *Soluțiile hipotonice* induc creșteri în volumul celular, iar cele *hipertonice* provoacă deshidratarea celulei pînă la egalizarea concentrației electroliților din spațiul intra- și extracelular.

Presiunea osmotică în interiorul celulei este identică cu cea din fluidul înconjurător, deoarece membranele implicate sînt total permeabile pentru apă, fiind ușor rupte de presiuni osmotice mici. Această caracteristică diferențiază celula animală de cea bacteriană și vegetală, la care peretele exterior al membranelor celulare este deosebit de rigid. În fluidul interstițial osmolaritatea este dată de cationi și anioni univalenți, pe cînd în fluidul intracelular de particule multivalente : Ca^{2+}, Mg^{2+}, fosfați și proteine. Concentrația în electroliți în interiorul celulelor, exprimată în miliechivalenți per litru este mult mai mare decît cea din exteriorul lor. Diferențele în compoziția fluidelor intracelular și extracelulare sînt datorate metabolismului celular și proprietăților membranelor celulare.

Corpul nu poate tolera modificări ale presiunii osmotice din fluidul intracelular, hiper- și hipotonicitatea conducînd la modificări ireversibile și letale la nivelul sistemului nervos central. Nu există un mecanism de control direct al presiunii osmotice intracelulare, ea fiind reglată de o serie de factori homeostatici care realizează o serie de procese feedback, Urina unui om adult conține o concentrație în NaCl variind de la 0 la 340 mmoli/*l*, concentrație ce este influențată de doi hormoni, la nivelul rinichiului — *vasopresina*, care mărește reabsorbția apei și *aldosteronul* care stimulează reabsorbția Na^+. Concentrația acestor doi hormoni în sînge este influențată de presiunea osmotică și concentrația Na^+ în fluidul extracelular. Deci, rinichiul elaborează o urină diluată cînd concentrația salină din plasmă scade și invers — elaborează o urină hipertonică, cînd concentrația salină crește. Consumul de apă este reglat și de un al treilea mecanism — senzația de sete, inițiată de osmoreceptorii din hipotalamus.

Difuzia facilitată și transportul activ sînt procesele care explică *trecerea unor biomolecule prin membrane de la concentrații mai mici către concentrații mai mari*, deci împotriva unui gradient de concentrație. Aceste procese au loc *în rinichi* și explică distribuția Na^+, K^+, glucozei, HCO_3^-, Cl^-, apei în celule și în diferite fluide extracelulare, explică mecanismul pompei Na^+/K^+ prin care ionii de sodiu sînt scoși din celulă iar ionii de potasiu sînt pompați în celulă etc. Biomoleculele care trec printr-o membrană împotriva unui gradient de concentrație realizează un transport activ în care este implicat un compus macroergic, ATP — prin hidroliza căruia se eliberează energia necesară realizării acestui proces. Difuzia facilitată realizează un transfer prin membrană, în direcția gradientului de concentrație, la o viteză mult mai mare decît cea observată într-o difuzie simplă. Mecanismul difuziei facilitate presupune existența unor molecule „purtă-

tor", care facilitează procesul de difuzie şi nu necesită prezenţa moleculelor de ATP.

Schimburile de apă şi electroliţi de la nivelul rinichiului

Sîngele pătrunde prin reţeaua glomerulară a capilarelor arteriale, cînd o serie de substanţe cu mase moleculare mici filtrează prin *capsula Bowman*. Filtratul glomerular este izotonic şi conţine pe lîngă apă, K^+, Na^+, Cl^-, HCO_3^-, SO_4^{2-} şi fosfat anorganic, glucoză şi creatinină. Acest filtrat este condus la *tubulii proximali* — nivel al nefronilor la care are loc principala reabsorbţie a apei şi sodiului. 75% din cantitatea Na^+ din filtrat este transportat spre sînge, apa deplasîndu-se prin difuzie pasivă. La nivelul *ansei lui* H e n l e se absorb alte 15% din cantitatea de Na^+ a filtratului şi aproximativ 5% din apa filtratului. Lichidul hipotonic rezultat trece prin *tubul distal* şi prin *tubul de colectare* — impermeabile pentru apă. Sulfatul şi creatinina sînt excretaţi în totalitate; PO_4^{3-}, HCO_3^-, H^+, Cl^-, CO_2 sînt eliminaţi sau adsorbiţi la nivelul nefronilor ca răspuns la diferitele situaţii care pot afecta homeostazia în scopul menţinerii constante a echilibrului acido-bazic. O mare parte din cantitatea de uree din filtratul glomerular este excretată prin urină, iar glucoza este complet absorbită dacă concentraţia ei în filtrat nu a depăşit o valoare prag — 150 mg%. La nivelul tubului distal, ionii de Na^+ rămaşi neabsorbiţi sînt schimbaţi de ioni de H^+, NH_4^+, K^+ care provin din sînge. Reabsorbţia selectivă a apei şi Na^+ este sub control hormonal, realizat de vasopresină şi respectiv de aldosteron. Fenomenul de filtrare glomerulară se realizează cu o viteză medie de 150 litri sînge/zi, realizîndu-se un volum de urină care variază de la 500 — 2 000 ml/zi. Aproximativ 99% din apă şi din cantitatea de Na^+ este reabsorbită, vitezele de reabsorbţie a celor două componente anorganice fiind controlate separat.

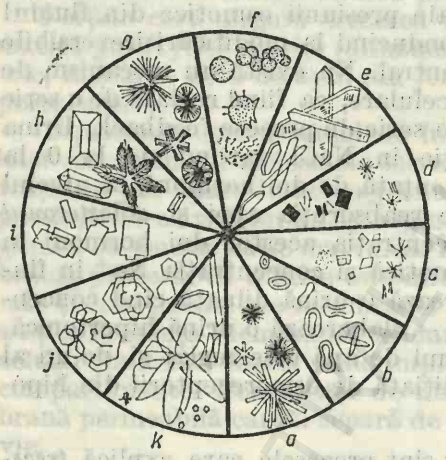


Fig. 22.3. — Compoziţia sedimentului urinar examinat la microscop :
a. — fosfat de calciu; *b.* — oxalat de calciu; *c.* — bilirubină; *d* — albastru de indigo; *e.* — acid hipuric; *f.* — uraţi; *g.* — cristale de sulfamide; *h.* — cristale de fosfat amoniacal de magneziu; *i.* — plachete de colesterol; *j.* — cristale hexagonale de cistină; *k.* — cristale de acid uric.

Urina are o greutate specifică de 1,003—1,030, este normal acidă (*p*H 6,0), conţinînd Cl^-, SO_4^{2-} şi PO_4^{3-}. Prezenţa fosfatului în urină reprezintă un mecanism reglator important deoarece excreţia lui ca $H_2PO_4^-$ este una din căile majore prin care ionii de Na^+ sînt conservaţi. Sedimentele chimice amorfe şi cristaline prezente în urină sînt ilustrate în figura 22.3.

La o scădere a *p*H extracelular datorată creşterii CO_2 alveolar sau scăderii concentraţiei HCO_3^- rinichiul răspunde prin două mecanisme : excreţia urinei acide şi a NH_4^+. La o creştere a *p*H rinichiul răspunde prin excreţia Na^+, HCO_3^-. Urina acidă poate avea un *p*H de minimum 4,6, aciditatea fiind datorată anionului $H_2PO_4^-$.

În fluidul extracelular, la *p*H 7,4 raportul $[HPO_4^{2-}] / [H_2PO_4^-]$ este de 4 :1 adică 80 % din fosfatul plasmatic se găseşte sub formă de HPO_4^{2-}.

Rinichii reglează balanţa acido-bazică controlînd concentraţia HCO_3^- din sînge şi ajustînd reabsorbţia acestui anion din filtratul glomerular. Pragul renal al HCO_3^- este 27—30 *mE*/litru. Aproximativ 90 % din cantitatea HCO_3^- din filtrat este reabsorbită la nivelul tubulilor nefronilor. Ionii de Na^+ sînt transportaţi din lumenul nefronului (filtrat) în celulele tubulare, prin schimburi cu ioni de K^+ şi de H^+. Ionii de H^+ intră în următoarele reacţii :

$$H^+ + NH_3 \longrightarrow NH_4^+$$
$$H^+ + HPO_4^- \longrightarrow H_2PO_4^-$$
$$H^+ + HCO_3^- \longrightarrow H_2CO_3 \longrightarrow CO_2 + H_2O$$

Dioxidul de carbon difuzează în celulele tubulare, este rehidratat cu formarea acidului carbonic, care disociază la anion bicarbonat şi proton. Anionul HCO_3^- trece în plasma sanguină renală, împreună cu cationul Na^+. CO_2 din celula tubulară şi cel din plasma sanguină se găsesc în echi-

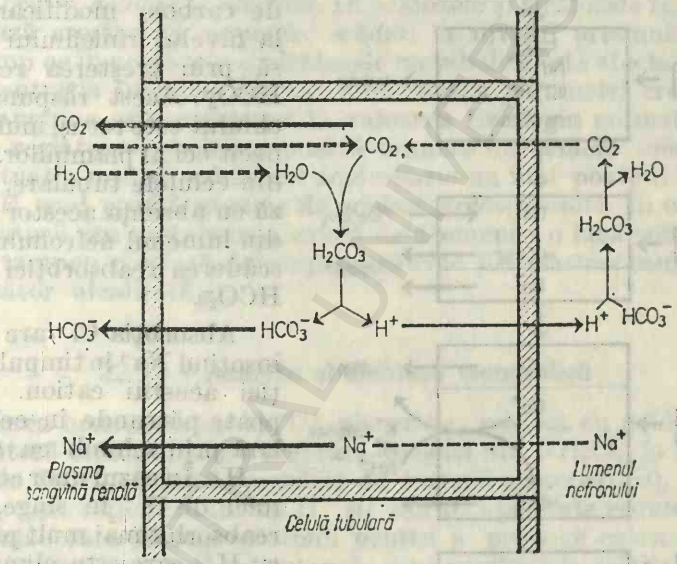


Fig. 22.4 — Procesele de difuzie a dioxidului de carbon şi acidului carbonic la nivelul tubilor renali.

libru (fig. 22.4). Prin urmare în controlul renal, acido-bazic funcţionează trei mecanisme :

HCO_3^-/CO_2

$HPO_4^{2-}/H_2PO_4^-$

schimbul H^+, Na^+, K^+/NH_4^+

Un alt mecanism de combatere a acidozelor prelungite este substituirea Ca^{2+} cu ionul Na^+, în urină. $Ca_3(PO_4)_2$ din oase devine mai solubil prin scăderea *p*H, intrînd în plasmă şi reacţionînd astfel :

$$3\,Ca^{3+} + 2\,PO_4^{3-} + 2H_2CO_3 \longrightarrow 3Ca^{2+} + 2HPO_4^{2-} + 2HCO_3^-$$

reprezentînd un mecanism extrem de eficient pentru prevenirea scăderii rezervei alcaline (concentrația anionului HCO_3^-), deși are loc o substanțială demineralizare a scheletului.

Electroliții controlează *p*H prin concentrațiile Na^+, K^+ și H^+. Filtratul glomerular conține: Na^+, K^+, HCO_3^-, Cl^-, HPO_4^{2-}. Pe măsură ce trec prin nefroni Na^+ total și K^+ parțial sînt reabsorbiți, iar ionii H^+ sînt legați prin reacția lor cu HPO_4^{2-} cu formare de $H_2PO_4^-$ și prin reacția cu NH_3 rezultat din dezaminarea *L*-glutaminei la *L*-glutamat, cu formare de NH_4^+. Compoziția filtratului la nivelul inferior al nefronului devine: NH_4^+, Cl^- și $H_2PO_4^-$.

Dacă concentrația K^+ din plasmă este mult crescută, acest cation este schimbat cu H^+ intracelular. Concentrația mare a H^+ în mediul extracelular este tamponată de HCO_3^-, cu formare de H_2CO_3 care se descompune în CO_2 și H_2O, reacție care conduce la creșterea presiunii parțiale a dioxidului de carbon, modificare simțită la nivelul rinichiului și tradusă prin creșterea reabsorbției HCO_3^-. Acest răspuns al rinichiului este totuși mult mai lent decît cel al plămînilor. Lipsa H^+ din celulele tubulare, se soldează cu absența acestor cationi și din lumenul nefronului, deci cu scăderea reabsorbției anionului HCO_3^-.

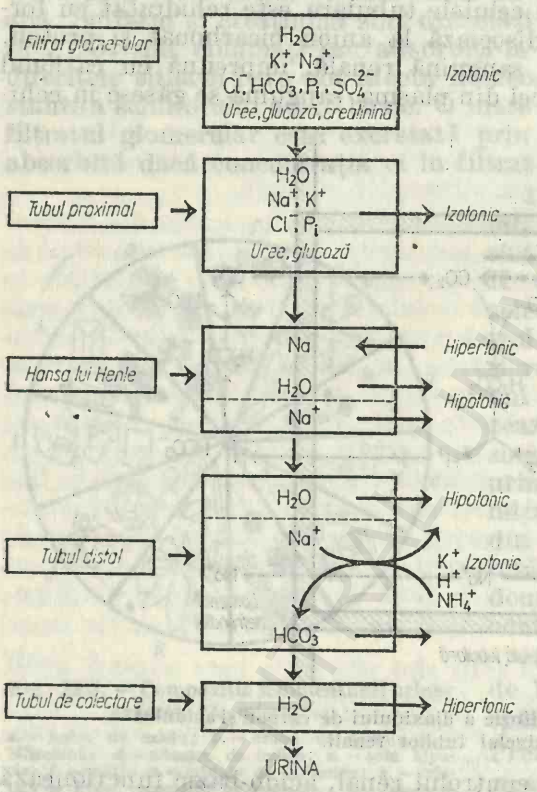


Fig. 22.5 — Schimbul de apă și de electroliți la nivelul nefronului.

Absorbția Cl^- are loc pasiv însoțind Na^+ în timpul reabsorbției acestui cation. Na^+ mai poate pătrunde în celula tubulară prin schimb cu alt cation — H^+. În cazul unor concentrații mici de Cl^- în sînge, Na^+ este reabsorbit mai mult prin schimb cu H^+, care este eliminat în lumen, influențînd și mărind reabsorbția HCO_3^- (fig. 22.5).

Mineralocorticosteroizii sau 17-hidroxiglucocorticoizii stimulează reabsorbția Na^+ sau secreția de H^+, deci reabsorbția HCO_3^-.

Celulele, de asemenea, participă la reglarea pH extracelular. Celulele țesutului muscular, epiteliul renal tubular și toate celulele în general realizează un mecanism de schimb ionic ce mediază un schimb prin membrana celulară de Na^+ pentru K^+ sau / și H^+.

În alcaloză, datorită creșterii concentrației HCO_3^- extracelulare, Na^+ intră în celule prin schimb cu H^+ și K^+. Protonii reacționează cu HCO_3^-

extracelular și CO_2 rezultat este expirat. K^+ este excretat în urină cu o cantitate echivalentă de HCO_3^-, rezultatul net fiind scăderea concentrației HCO_3^- extracelulare.

În acidoză, Na^+ iese din celule, unde pătrunde H^+ și K^+. Prin intrarea protonilor în celulă, în fluidul extracelular rămîn cantități mari de HCO_3^- în urma disocierii H_2CO_3.

22.5.1. Dereglări ale echilibrului acido-bazic

În situații fiziologice normale, *p*H plasmei sanguine este 7,35—7,45, raportul HCO_3^-/CO_2 dizolvat = 20, iar concentrația totală în CO_2 este 26—27 *mE/l*.

Datele experimentale obținute cu coloranți vitali indică un *p*H intracelular ce variază de la 4,5 în celulele prostatei la *p*H 8,5 în osteoblaști.

Abaterile de la aceste valori normale caracterizează maladii metabolice și respiratorii — *acidoza* și *alcaloza*. În acidozele și alcalozele respiratorii se înregistrează creșteri și respectiv scăderi la nivelul presiunii parțiale a CO_2, în timp ce în acidozele și alcalozele metabolice este afectată în același sens concentrația în anion HCO_3^-. Cînd acești parametri cresc, dar *p*H plasmei sanguine este menținut la valoarea fiziologic normală prin mecanismele reglatoare, maladia poartă numele de *acidoză compensată*, în timp ce situația în care echilibrul acido-bazic nu mai poate fi restabilit și valorile *p*H scad poartă numele de *acidoză decompensată*. În cazul alcalozei respiratorii sau metabolice, există de asemenea o fază compensată de sistemele tampon și o fază decompensată cînd *p*H plasmei sanguine crește corespunzător alcalinității.

22.5.1.1 Acidoza și alcaloza metabolică

Reducerea concentrației HCO_3^- plasmatic, soldată cu acidoză, are loc la o biosinteză crescută sau o ingerare de acizi sau NH_4Cl, la o eliminare excesivă de HCO_3^- (diaree, pierderi de secreții pancreatice), boli renale soldate cu o excreție scăzută de H^+ și/ sau o capacitate redusă de a produce amoniac care să lege protonii pentru a produce cationi NH_4^+ etc. Printr-o ventilație pulmonară intensă, care conduce la scăderea presiunii parțiale a CO_2, se realizează compensarea scăderii concentrației în HCO_3^-.

Alcalozele caracterizate prin creșterea concentrației anionului bicarbonat în plasma sanguină apar cînd se pierd cantități importante de HCl (prin vomă), cînd se administrează săruri ale unor acizi slabi cu baze tari ($NaHCO_3$, lactat sodic etc.), cînd se resorb cantități anormal de mari de alcalii, la nivelul rinichilor etc. Printr-o hipoventilație pulmonară, crește presiunea parțială a CO_2 care poate compensa starea metabolică de alcaloză. Concentrația anionului HCO_3^- din plasmă scade, acest anion intră în plasmă din eritrocite prin schimb cu Cl^-. Din reacția :

$$H_2CO_3 + Hb \rightleftharpoons HCO_3^- + Hb \cdot H^+$$

rezultă HCO_3^-, care poate restabili *p*H plasmei. Alcaloza metabolică este compensată pulmonar, renal și prin schimb H^+-Na^+ celular.

Creşterea $[HCO_3^-]$ plasmatic este compensată prin aceleaşi mecanisme : deplasare de Cl^-, hipoventilaţie, urină alcalină şi schimb Na^+ plasmatic — H^+ şi K^+ celular.

22.5.1.2 Acidoza şi alcaloza respiratorie

Acidoza respiratorie rezultă în urma maladiilor pulmonare cronice cînd presiunea parţială a CO_2 creşte considerabil. Rinichiul compensează aciditatea prin formarea anionului HCO_3^- (din CO_2) şi creşterea reabsorbţiei lui la nivelul tubulilor nefronului. De asemenea, se înregistrează o secreţie crescută a ionilor de H^+ pe cale urinară.

Alcaloza respiratorie se produce în hiperventilaţii pulmonare, cînd presiunea parţială a CO_2 scade rapid, H^+ se combină cu HCO_3^- plasmatic conducînd la formarea acidului carbonic care sub acţiunea catalitică a anhidrazei carbonice disociază în CO_2 şi apă, mecanism care conduce în final la scăderea concentraţiei H^+ din plasmă, deci la o creştere a alcalinităţii. Rinichiul compensează această dereglare a balanţei acido-bazice prin reducerea reabsorbţiei HCO_3^- şi creşterea excreţiei de Na^+ şi K^+.

În cazurile de hiperventilaţie scade $[H_2CO_3]$ extracelular şi *p*H creşte, devenind alcalin. Deoarece P_{CO_2} arterială este scăzută, hemoglobina tamponează diminuînd $[HCO_3^-]$ plasmatică — capacitate ce nu poate compensa total creşterea de *p*H. Hipoventilarea ce apare în urma injectării morfinei, în cazurile de pneumonii oedeme pulmonare duce la scăderea *p*H extracelular. P_{CO_2} crescută are ca rezultat creşterea $[HCO_3^-]$ din plasmă, modificare numită *acidoză respiratorie*. Compensarea în ambele cazuri este efectuată de rinichi, care excretă o urină alcalină şi respectiv o urină acidă. Au loc şi procese de schimb celular. În alcaloza respiratorie, Na^+ se schimbă cu K^+ şi H^+ ameliorînd consecinţele alcalozei extracelulare. În acidoza respiratorie, Na^+ este scos din celule, care sînt acidifiate prin pătrunderea protonilor.

Alte dereglări ale echilibrului acido-bazic sînt datorate pierderii unor lichide extracelulare sau formării corpilor cetonici (v. cap. 17) precum şi în unele maladii în care au loc hemoragii, pierderi de exudate seroase, secreţii ale tractului gastrointestinal etc. Raportul $[Cl^-] / [HCO_3^-]$ în fluidul extracelular normal este 4. Dacă acest raport în cazul fluidului pierdut este mai mare de 4, $[Cl^-]$ din fluidul extracelular scade, iar $[HCO_3^-]$ creşte conducînd la stări de alcaloză. Această situaţie apare în cazul pierderilor masive prin transpiraţie, în stări de vomă datorate unor obstrucţii pilorice sau duodenale etc. Cînd valoarea acestui raport este mai mică de 4, apare acidoza (stări prelungite de diaree).

Acidoza apare dacă un acid HX, mai puternic decît H_2CO_3 pătrunde în circulaţie cu o viteză mai mare decît poate fi excretat şi au loc acumulări masive de X^-, datorită reacţiei :

$$HX + HCO_3^- \rightleftharpoons H_2CO_3 + X^-$$

În acest fel au loc acumulări de corpi cetonici — acetona, acid acetoacetic şi acid β-hidroxibutiric, la bolnavii de diabet, la persoanele în a căror hrană abundă lipidele sau în timpul unor perioade de inaniţie.

BIBLIOGRAFIE

Aasa, R., Aisen, P.: J. Biol. Chem., *243*, 2399, 1968

Acher, R., Chauvet, J., Lenci, M. T.: Bull. Soc. Chim. Biol., *40*, 2005, 1958

Acher, R.: The neurohypophyseal hormones: An example of molecular evolution, in *„Molecular evolution. Biochemical evolution and the origin of life"*, editat de E. Schoffeniels, Amsterdam, London, North-Holland Publ. Co., 1971, pp. 43—51

Agaranoff, B. W., Bradley, R. M., Brady R. O.: J. Biol. Chem., *233*, 1077, 1958

Ahrem, A. A., Levina J. S., Titov, Yu. A.: *Ekdizont-steroidn'ie gormoni nasekomih*, Minsk, Izd. „Nauka i tek'nica", 1973

Alexander P., Block, R. J.: *A laboratory manual of analytical methods of protein chemistry (including polypeptides)*, vol. 1—3, London, Oxford, New York, Paris, Pergamon Press, 1960—1961

Allen, E. H., Schweet, R. S.: Biochim. Biophys. Acta, *39*, 185, 1960

Allfrey, V. G., Mirsky, A. E., Osawa, S., J. Gen. Physiol., *40*, 451, (1957)

Allfrey, V. G., Mirsky, A. E., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., *28*, 247, (1963)

Altman, S.: Nature (New Biol.), *229*, 19, 1971

Ambler, R. P.: Biochem. J., *135*, 751, 1973

Ames, B. N., Hartman, P. E., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., *28*, 349, 1963

Ames, B. N., Martin, R. G.: Ann. Rev. Biochem., *33*, 235, (1964)

Anastasi, A., Erspamer, V.: Arch. Biochem. Biophys., *101*, 56, 1963

Anastasi, A., Erspamer, V., Cei, J. M.: Arch. Biochem. Biophys., *108*, 341, 1964

Anastasi, A., Erspamer, V., Endean, R.: Experientia, *23*, 699, 1967

Anderson S.: Gastroenterology, *67*, 742, 1974

Anderson, J. C., Barton, M. A., Gregory, R. A., Hardy P. M., Kenner, G. W., Mac Leod, J. K., Preston, J., Sheppard R. C., Morley, J. S.: Nature, *204*, 933, 1964

Anfinsen, C. B.: *The molecular basis of evolution*, New York, J. Wiley and Sons, 1961

Anssel, G. B., Norman, J. M.: J. Neurochem., *1*, 32, 1956

Apgar, J., Holley, R. W.: Biochem. Biophys. Res. Communn., *16*, 121, 1964

Arnaud, C. D., Brewer, H. B. jr.: Parathyroid Hormone: Structure and Immunoheterogeneity, in „Calcium Metabolism, Bone and Metabolic Bone Diseases", editată de F. Kuhlencordt și H. P. Kruse, Berlin, Heidelberg, New York, Springer Verlag, 1975, pp. 295—315

39 — c. 636

Arnstein H. R. V., Cox, R. A.: Biochem. J., *93*, 33C, 1964

Aronoff, S.: *Techniques of Radiochemistry*. Iowa State College Press, 1956

Assan, R.: Le jeûne et sa régulation hormonal, în *„Hormones et régulation métaboliques"*, Paris, Masson et Cie, p. 209—225, 1973

Astwood, E. B., Raben, M. S., Payne, R. W., Grady, A. B.: J. Am. Chem. Soc., *73*, 2969, 1951

Astwood, E. B., Barrett, R. J., Friesen, H.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *47*, 1525, 1961

Attardi, G., Naono, S., Rouviere, J., Jacob, F., Gros, F.,: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., *28*, 363 (1963)

Attardi, G., Attardi, B.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *58*, 1051, 1967

August, J. T., Ortiz, P. J., Hurwitz, J. J.: J. Biol. Chem., *237*, 3786, 1962

Ault, R. G.: J. Inst. Brew., LXVIII, 405, 1961

Aurbach, G. D.: J. Biol. Chem., *234*, 3179, 1959

Austin, J.: The sterols of marine invertebrates and plants, în *„Adv. in Steroid Biochemistry and Pharmacology"*, editată de M. H. Brigg, vol. I, London and New York, Academic Press, pp. 73—96, 1970.

Autuori, F., Svensson, H., Dallner, G.: J. Cell Biol., *67*, 700, 1975

Avaeva, S. M., Mevkh, A. T.: Biokhimia, *36*, 163, 1971

Avery, O. T., Colin, M., Mac Leod, L., Mc. Carty, M.: J. Exptl. Med., *79*, 137, 1944

Ayling, J., Pirson, R., Lynen, F.: Biochemistry, *11*, 526, 1972

Baba, Y., Matsuo, H., Schally, A. V.: Biochem. Biophys. Res. Communn., *44*, 459, 1971

Babaev, T. A., Avanesova, A. A., Gussakovskii, E. E., Usmanov, T.: Biokhimia, *37*, 1306, 1972

Baddiley, J., Buchanan, J. G., Mathias, A. P., Sanderson, A. R., J. Biol. Chem., 4186, 1956

Baer, E., Pavanaram, S. K.: J. Biol. Chem., *236*, 1269, 1961

Bagyley, B. C., Stachelin, M.: Biochemistry, *8*, 259, 1969

Bahl, O. P.,: J. Biol. Chem., *244*, 507, 575, 1969

Bahl, O. P.: Some of the problems related to the primary structure of glycoprotein hormones, în *Structure-activity relationships of protein and polypeptide hormones*, Université de Liege, p. 99 1971,

Bailey, J. T.: *Techniques in protein chemistry*, Amsterdam, London, New York, Elsevier Publ. Co., 1967

Bain, J. A., Deutsch, H. F.: J. Biol. Chem. *172*, 547, 1948

Baldwin, E.: *Dynamic Aspects of Biochemistry*, V edition, Cambridge University Press, p. 416, 1967

Balş, M. G.: *Antibioticele*. Ediţia a II-a. Bucureşti, Editura Medicală, 1965

Barker, H. A., Smyth, R. D., Weissbach, H.: J. Biol. Chem., *235*, 480, 1960

Barker, K., Warren, J. C.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *65*, 1298 (1966)

Barnett, W. E., Jacobson, K. B.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *51*, 642, 1964

Baron, D. N., Dent, C. E., Harris, H., Hart, E. W., Jepson, J. B.: Lancet, *2*, 421, 1956

Bartsokas, St. K., Polychronopouluo, - Trichopolon A., Kouvetas, E. D., Charissiandou, A., Valsamakis, St., Kalaitzidou, C.,: Endokrinologie, *64*, 201, 1975

Basova, G. G., Ginodman, L. M., Biokhimia, *33*, 1023, 1968

Baulieu, E. E., Lasnitzki, I., Robel, P.,: Nature, *219*, 1155 (1968)

Bayev, A. A., Mirzabekov, A. D., Axelrod, V. D., Venkstern, T. V., Li, L., Krutilina, A. I., Fodor, I., Kazarinova, L.: Dokl. Acad. Nauk SSSR, *173*, 204, 1967

Bayev, A. A., Venkstern, T. V., Mirzabekov, A. D., Krutilina, A. I., Axelrod, V. D., Li, L., Fodor, I., Kasarinova, L. Ya., Engelgardt, V. A.: Studies of the primary structure and function of yeast valine transfer RNA, în *Structure and Function of Transfer RNA and 5SRNA*, editată de Fröholm, L. O., Laland, S. G., New York, London, Academic Press, p. 17—36, 1968

Beadle, G. W., Tatum, E. L.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *27*, 449, 1941

Beal, P. F., Babcock, J. C., Lincoln, F. H.: J. Am. Chem. Soc., *88*, 3131, 1966

Van Beeumen, J., Ambler, R. P., Meyer, T. E., Kamen, M. D., Olson, J. M., Shaw, E. K: Biochem. J., *159*, 757, 1976

Behrens, N. H., Leloir, L. F.: Proc. Nat'. Acad. Sci. USA, *66*, 153, 1970

Behrens, N. H., Parodi, A. J., Leloir, L. F.,: Proc. Nat'. Acad. Sci. USA, *68*, 2857, 1971, *a*

Behrens, N. H., Parodi, A. J., Leloir, L. F., Krisman, C.: Arch. Biochem. Biophys., *143*, 375, 1971. *b*

Beinert, H., Sands, R. H.: Biochim. Biophys. Res. Communn., *3*, 41, 1960

Bell, E.: Nature (London), *224*, 326, 1969

Bell, G. D., Whitney, B., Dowling, R. H.: Lancet, *II*, 1213, 1972

Bennet, T. P.: *Graphic Biochemistry*, vol. 2. Metabolism of Biological Molecules, New York, The Mac Millan Comp., Collier Mac Millan Ltd., London. 1968

Bennett, H. P. J., Lowry, P. J., Mc Martin C., Scott, A. P.: Biochem. J., *141*, 439, 1974

Benzer, S: The elementary units of heredity, în *„Selected Papers on Molecular Genetics"*, editată de Taylor, J. H., New York, London, Academic Press, 1965

Bergmann, W., Schell, H. P., Low E. M.: J. Org. Chem., *10*, 580, 1945

Bergmann, W.: în *„Comparative Biochemistry"*, M. Florkin și H. S. Mason editori, vol. 3, p. 103, New York, London, Academic Press.

Bergström, S., Sjövall, J.: Acta Chem. Scand., *14*, 1693, 1960

Bergström, S., Ryhage, R., Samuelason, B. Sjövall, J.: J. Biol. Chem., *238*, 3555, 1963

Bergström, S., Danielsson, H, Klenberg, D., Samuelsson, B.: J. Biol. Chem., *239*, PC 4006, 1964

Bergström, S., Samuelson, B.: Ann. Rev. Biochem., *34*, 101, 1965

Bergström, S.: Science, *157*, 382, 1967

Bernfeld, P.: *Biogenesis of natural compounds*. Oxford, London, New York, Paris, Pergamon Press, 1963

Bersin, T.: *Biochemie der Vitamine*. Frankfurt am Main, Akademische Verlagsgesellschaft, 1966

Bewley, Th. A., Sairam, R., Lichoh Hao: Arch. Biochem. Biophys., *163*, 625, 1974

Black, J. A., Dixon, G. H.: Nature, *218*, 736, 1963

Blair, E. L., Sherratt, H. S. A., Wood, D. D.: Biochem. J., *104*, 54 P, 1967

Blake, R. D., Fresco, J. R., Langridge, R.: Nature, *225*, 32, 1970

Bloch, E.: *Lipid Metabolism*, New York, John Wiley and Sons. Inc., 1960

Blomstrom, D. C., Knight, E., Phillips, W. D., Weiher, J. F.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *151*, 1085, 1964

Bodanszky, M., Klausner, Y. S., Said, S. I.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *70*, 382, 1973

Bodea C. (editor): *Tratat de biochimie vegetală*, vol. I (1964), vol. II (1965), vol. III (1966), București, Editura Academiei R. S. România

Boeri, E.: Non-porphyrin metalloproteins, în *„Comprehensive biochemistry"*, editată de Florkin, M., Stoz, E. H., vol. 8, Amsterdam, New York, London, Elsevier Publ. Co. p. 38, 1963.

Boid, R., Rees, H. H., Goodwin, T. W.: Biochem. Soc. Trans., *2*, 1066, 1974

Boivin, A., Vendrely, R., Vendrely, C.: C. R. Acad. Sci. Paris, *226*, 1061, 1948

Bond, H. E., Cooper, J. A., Courington, D. P., Wood, J. S.: Science, *165*, 705, 1969

Bonner, J., Huang, R. C.: J. Mol. Biol., 6, 169 (1963) a

Bonner, J., Huang, R. C., Gilden, R. V.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA, *50*, 893 (1963) b

Bonner, J.: *The molecular biology of development*, Oxford, Clarendon Press, 1965

Bonner, J., Dahmus, M. D., Fambrough, D., Huang, R. C., Marushige, K., Tuan, D.Y.H.: Science, *159*, 47, 1968

Bosmann, H. B., Case, K. R.: Biochem. Biophys. Res. Communn., *36*, 830, 1969 *a*

Bosmann, H. B., Martin, S. S.: Science, *164*, 190, 1969, *b*.

Bower, A., Hadley, M. E., Hruby, V. J.: Science, *184*, 70, 1974

Brachet, J.: *The biochemistry of development*, London, New York, Paris, Los Angeles, Pergamon Press, 1960

Brachet, J.: *Chemical Embriology*. New York Interscience Publ. Inc., 1950

Brady, R. O., Formica, J. V., Koval, G. J.: J. Biol. Chem.: *233*, 1072, 1958

Brady, R. O., Koval, G. J.: J. Biol. Chem., *233*, 26, 1958

Bratu, V., Lorkin, P. A., Lehmann, H., Predescu, C.: Biochem. Biophys. Acta, *251*, 1, 1971

Bratu, V.: Studii şi cercetări de biochimie, *12*, 275, 1969

Brazeau, P., Vale, W., Burgus, R., Ling, N., Butcher, M., Rivier, J., Guillemin, R.: Science, *179*, *17*, 1973

Bray, R. C., Malmström, B. G., Vänngård, T.: Biochem. J., *73*, 193, 1959

Bray, D., Robbins, P. W.: Biochem. Biophys. Res. Communn., *28*, 334, 1967

Brewer, J. M., Weber, G.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *59*, 216, 1968

Brian, P. W., Hemming, H. G., Lowe, D.: Annals of Botany N. S., *22*, 539, 1958

Brian, P. W., Hemming, H. G.; Nature, *189*, 74, 1961

Brian, P. W., Hemming, H. G., Lowe, D.: Nature, *193*, 946, 1962

Brian, P. W.: *Gilberellins and th ir Biological Significance*, Proc. of the tenth International Botanical Congress, 1964, 81—88

Britten, R. S., Kohne, D. E.: Scientific American, *11*, 24, 1970

Brockerhoff, H., Ballou, C. E.: J. Bol. Chem., *236*, 1907, 1961

Brockmann, H., Springorum, M., Traxler, G., Höfer, I.: Naturwiss., *50*, 689, 1955

Brody, S., Thorell, B.: Bioch m. Biophys. Acta, *25*, 579. 1957

Brody, S., Balis, M. E.: Nature, *182*, 940 1958

Brody, S., Balis, M. E.: Cancer Res., *19*, 538. 1959

Brown, D. H., Illingworth, B.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *48*, 1783, 1962

Brown, R. A., Davies, M., Englert, M., Cox, H. R.: J. Am. Chem. Soc., *78*, 5077, 1956

Bromer, W. W., Staub A., Diller E. R. Bird, H. L., Sinn, L. G., Behrens, O. K.: J. Am. Chem. Soc., *79*, 2794, 1957

Bromer, W. W., Sinn, L. G., Behrens, O. K.: J. Am. Chem. Soc., *79*, 2794, 1957

Bromer, W. W., Staub, A., Sinn, L. G., Behrens, O. K.: J. Am Chem. Soc., *79* 2801, 1957

Bromer, W. W., Sinn, L. G., Behrens, O. K.: J. Am. Chem. Soc., *79*, 2807, 1957

Bromer, W. W., Boucher, M. E., Koffenberger, J. E. jr.: J. Biol. Chem., *246*, 2822, 1971

Brown, J. C., Dryburgh, J. R.: Can. J. Biochem., *49*, 867, 1971

Brown, J. C., Cook, M. A., Dryburgh, J. R.: G stroenterology, *62*, 401, 1972

Brown, J. C., Cook, M. A., Dryburgh, J. R.: Can. J. Biochem., *51*, 533, 1972

Brown, J. C.: Gastroenterology, *67*, 733, 1974

Brownlee, G. G., Sanger, F.: J. Mol. Biol., *23*, 337, 1967

Brownlee, G. G., Cartwright, E. M., Brown, B. G.: J. Mol. Biol., *34*, 379, 1968.

Brownlee, G. G., Cartwright, E. M., Brown, D. D.: J. Mol. Biol., *80*, *703*, 1974.

Brownlee, G. G.: J. Mol. Biol., *114*, 93, 1977

Brownlee, G. G. Biochem. Soc. Trans., 7, 279, 1979

Bruchovsky, N.: Endocrinology, *89*, 1212, 1971

Bruchovsky, N., Wilson, J. D.: J. Biol. Chem., *243*, 2012, 1968. *a*

Bruchovsky, N., Wilson, J. D.: J. Biol. Chem., 243, 5953, 1968, *b*

Buchanan, J. M., Sonne, J. C., Delluva, A. M.: J. Biol. Chem., *173*, 81 1948

Buddecke, E.: *Glicoproteins. Their composition, structure and function.* Ediția II, Editat de Gottschalk, A. Amsterdam, London, New York, Elsevier Publ. Co., p. 535. 1972

Buergi, W., Richterich, R., Colombo, J. P.: Nature (London), *211*, 854, 1966

Bumpus, F. M., Smeby, R. R., Khairallah, P. A., în Peptides: Chemistry and Biochemistry, editată de Weinstein, S., Lande, New York, Manel Dekker Inc, 1970, p. 126

Burdon, R. H., Clason, A. E.: J. Mol. Biol., *39*, 113, 1969

Burdon, R. H., Smellie, R.M.S.: Biochim. Biophys. Acta, *47*, 93, 1961.

Burdon, R. H., Smellie, R. M. S: Biochim. Biophys. Acta, *51*, 153, 1961

Burgus, R., Dunn, T. F., Desiderio, D., Guillemin, R.: C. R. Acad. Sci. *D 269*, 1870, 1969

Burgus, R., Dunn, T. F., Desiderio, D., Ward, D. N. Vale, W., Guillemin, R.: Nature, *226*, 321, 1970

Burgus, R., Butcher, M., Ling, N., Monahan, M., Rivier, J., Fellows, R., Amoss. M., Blackwell, R., Vale, W., Guillemin, R.: C. R. Acad. Sci, *D 273*, 1611, 1971

Burnea, I., Popescu, I., Neamțu, G., Stancu, E., Lazăr, Șt.: *Chimie și biochimie vegetală*, București, Editura didactică și pedagogică, 1977

Burton, K.: Biochem. J., *77*, 547, 1960

Buruiană, L. M.: *Contribuția lui H. Vasiliu la teoria structurii în spirală a proteinelor.* Conferința de Biochimie, 10—12 decembrie 1970

Buruiană, L. M.: Rev. zoot. și Med. vet. nr. 1, *20*, 1967

Buruiană, L. M.: *Curs de chimie biologică.* București, Institutul agronomic „N. Bălcescu", 1961.

Busch, H.: *Histones and other nuclear proteins*, London, Academic Press, 1965

Butenandt, A., Karlson, P.: Z. Naturforsch. *9b*, 389, 1954

Butler, W.W.S., Schade, A. L.: Endocrinology, *63*, 271 (1958)

Caccam, J. F., Jackson, J. J., Eylar, E.H.: Biochem. Biophys. Res.Communn., *35*, 505, 1969

Cairns, J.: J. Mol. Biol., *3*, 756, 1961

Cairns, J. J. Mol. Biol., *6*, 208, 1963

Calendar, R., Berg, P.: J. Mol. Biol., *2*, 39, 1967

Campbell, W. H., Orme-Johnson, W. H., Burris, R. H.: Biochem. J.: *135*, 617, 1973

Canal, J., Rouffy, J.: *Les hyperlipoproteinemies: conception modernes et methodes d'exploration. Problemes actuels de biochimie appliquée*, edité par M. L. Girard, Paris, Masson et Cie, 1970, p. 1—42.

Caputto, R., Leloir, L. F., Cardini, C. E., Paladini, A. C.: J. Biol. Chem., *184*, 333, 1950

Carrico, R. J., Deutsch, H. F., Beinert, H., Orme-Johnson, W. H.: J. Biol. Chem., *244*, 4141, 1969

Carter, H. E.,: J. Biol. Chem., *233*, 1309, 1958

Caspersson, T.: Naturwiss., *29*, 33, 1942
Cazacu, O.: *Polimorfismul proteic în ameliorarea animalelor*, București, Editura Ceres, 1971
Cerasi, E., Luft, R.: în *Hormones et regulation metaboliques*, Paris, Mason et Cie, p. 235, 1973
Chantrenne, H.: *The biosynthesis of proteins*, Oxford, London, New York, Paris, Pergamon Press, 1961
Chargaff, E.: Davidson, J. N. *The Nucleic Acids*. Chemistry and Biology. New York, Academic Press, 1955.
Charet, P., Monsigny, M., Spik, G., Montreuil, J.: C. R. Acad. Sci., Paris, *269*, 1019, 1969
Chargaff, E. *Experientia*, *6*, 201, 1950
Chauvet, J., Chauvet, M.T., Acher, R.: Bull. Soc. Chim. Biol., *45*, 1369, 1963
Cheftel, R. I., Moretti, J.: C. R. Acad. Sci. Paris, *262*, 1982, 1966
De Clercq, E., Merigan, T. C.: Nature, *222*, 1148, 1969
Childs, B., Nyhan, W. L.: Pediatrics, *33*, 403, 1964
Chrétien, M., Lis, M., Bertagna, X., Gilardeau, C.: în *Hormones et regulation metaboliques*, Paris, 1973, Masson et Cie, 1973 p. 249
Cleland, R. E.: The Gibberellins. în *The Physiology of Plant Growth and Development*, editată de Wilkins, M. B., London Mc Graw-Hill, 1969 p. 49
Cline, M. J., Eason, R., Smellie, R.M.S.: J. Bol. Chem., *238*, 1788, 1963
Cohn, M.: Biochemistry, *2*, 623, 1963
Cohn, M., Leigh, J. S.: Nature, *193*, 1037, 1962
Collins, F. D., Shotlander, V. L.: Biochem. J., *79*, 321, 1961
Colombo, J. P., Richterich, R., Donath, A., Spahr, A., Rossi, E.: Lancet, *1*, 1014, 1964
Craig, L. C., Hausmann, W., Weisiger, J.: J. Am. Chem. Soc., *77*, 721, 1955
Craig, L. C., Hausmann, W., Weisiger, J.: J. Biol. Chem., *199*, 865, 1952
Craig, N. C.: Ribosomal RNA, Synthesis în Eukaryotes and its Regulation. în *Biochemistry of Nucleic Acids*, editată de K. Burton, Butterworths, London, Baltimore, 1974
Cohn, E. J., Edsall, J.T.: *Proteins, Amino Acids and Peptides*, New York, Reinhold, 1943
Coleman, J. E., Vallee, B. L.: J. Biol. Chem., *236*, 2244, 1961
Corcoran, M. R., West, C. A.: Plant Physiol., *43*, 859, 1968
Creutzfeldt, M.: Gastroenterology, *67*, 748, 1974
Crick, F. H. C., Barnett, L., Brenner, S., Watts-Tobin, R. J.: Nature, *192*, 1227, 1961
Crick, F. H. C.: *Progress in Nucleic Acid Research*, vol. I, edited by J. N. Davidson și W. E. Cohn, New York, London, Academic Press, 1963. p. 163
Crick, F. H. C.: J. Mol. Biol., *19*, 548, 1966
Cseh, G., Graf, L., Sutka, C.: Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung., *8*, 245, 1973
Dahmus, M., Bonner, J.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *54*, 1370, 1965
Daughaday, W.H., Hall, K., Raben, M. S., Salmon, W. D. jr. Van den Brande, J. L., Wyk. J. J.: Nature, *235*, 107, 1972
Davidson, P. F., Freifelder, D., Hede, R., Levinthal, C.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *47*, 1123, 1961
Davies, D.D., Giovanelli, J., Rees, T.: *Plant Biochemistry*, Oxford, Blackwell Scientific Publication, 1964
Davis, B. D.: Adv. Enzymol., *16*, 247, 1955
Dawson, R. M. C.: Biochem. J., *60*, 325, 1955
Dawson, R. M. C., Dittmer, J. C.: Biochem. J., *76*,42, P, 1960
Dawson, R. M. C.: Biochem. J., *62*, 693, 1956
Dawson, R. M. C.: Biochem. J., *62*, 689, 1956
Dawson, R. M. C.: Biochem. J., *64*, 192, 1956

Dayhoff, M. O.: *Atlas of protein sequence and structure*, Vol. 5, Washington, National Biomedical Research Foundation, 1972

Deisseroth, A., Dounce, A. L.: Physiol. Rev., *50*, 319, 1970

Dent, C. E., Friedman, M., Green, H., Watson, L. C. A.: Brit. med. J., *1*, 403, 1965

Dekker, C. A., Stone, D., Fruton, J. S.: J. Biol. Chem., *181*, 719, 1949

Descomps, B., Barjon, P., Crasitis, A.: Path. Biol., *15*, 78, 1967

Dickens, F.: Biochem. J., *32*, 1626, 1938 a.

Dickens, F.: Biochem. J., *32*, 1646, 1938 b.

Dixon, M., Webb, E. C.: *The Enzymes*, Second Edition, London, Longmans, 1964

Doby, G.: *Plant biochemistry*, London. New York, Sydney, Interscience Publishers, 1965

Doctor, B. P., Loebel, J. E., Kellogg, D. A.: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., *31*, 543, 1966

Dorfman, A., Lorincz, A. E.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *43*, 443, 1957

Van Dorp, D. A., Beerthuis, R. K., Nygteren, D. H., Vonkeman, H.: Nature, *203*, 839, 1964

Doudoroff, M., MacGee, J.: J. Biol. Chem., *210*, 617, 1954

Dular, E. La Bella, F., Vivian, S., Eddie, L.: Endocrinology, *94*, 563, 1974

Dulbecco, R., Vogt, M.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *50*, 236, 1963

Dullner, G., Behrens, N. H., Parodi, A. J., Leloir, L. F.: FEBS Letters, *24*, 315, 1972

Dumitru, I. F.: Stud. cerc. biochim., *4*, 561, 1962

Dumitru, I. F.: Stud. cerc. biochim., *3*, 435, 1962

Dumitru, I. F.: Stud. cerc. biochim., *4*, 573, 1962

Dumitru, I. F.: *Vitamine. Chimie, biochimie și fiziologie*. Centrul de mutiplicare al Universității din București, 1970

Dumitru, I. F.: *Hormonii*. Centrul de multiplicare al Universității din București, 1970

Dumitru, I. F., Mager, S., Turcu, A.: *Biochimie generală cu elemente de biochimie comparată*, București, Editura Didactică și Pedagogică, 1973

Dumitru, I. F., Iordăchescu, D.: *Enzime*. Editura medicală, 1974

Duncan, F. (editor), *Bolile metabolismului*, București, Editura medicală, 1966

Dunn, J. T., Spiro, R.: J. Biol. Chem., *242*, 5549, 1967

Dunn, J. T., Spiro, R.: J. Biol. Chem., *242*, 5556, 1967

Durand, M., Favard, P.: *La cellule*. Paris, Hermann, 1967. *Chemical Zoology*. Edited by Florkin, M., Scheer, B. T., vol. I, *Protozoa*, New York, London, Academic Press, 1967

Dutrieu, J.: C. R. Acad. Sci. (Paris), *252*, 317, 1961

Dyck, W. P., Bonnet, D., Lasater, J., Stinson, Ch., Hall, F. F.: Gastroenterology, *66*, 533, 1974

Ebel, J. P.: Bull. Soc. Chim. Biol., *50*, 2255, 1968

Ebel, J. P.,: Structure des acides ribonucleiques, în „*Problemes actuels de biochimie générale*" Boulanger, P., Polonovski, J., editeurs, Paris, Masson et Cie, 1972, p. 89

Edmons, M., Caramela, M. G.: J. Biol. Chem., *244*, 1314, 1969

Ehrenberg, A., Reichard, P.: J. Biol. Chem., *247*, 3485, 1972

Von Ehrenstein, G., Lipmann, F.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *47*, 941, 1961

Von Ehrenstein, G, Dais, D.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *50*, 81, 1963

Ehresmann, C., Fellner, P., Ebel, J. P.: Nature, *227*, 1321, 1970

Elhammer, A., Svensson, H., Autuori, F., Dallner, G.: J. Cell. Biol., *67*, 715, 1975

Ellis, R. B., Kemp, P., Hawthorne, J. N.: Biochem. J., *76*, 43 P, 1960

Elson, G. W., Jones, D. F., Mac Millan, J., Suter, P. J.: Phytochemistry, *3*, 93, 1964

Elovson, J., Vagelos, P. R.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *62*, 957, 1969

Eltzina, N. V.: Uspekhi sovrem. biol., *80*, 399, 1975

Emmerson, P. T.: DNA Replication in Escherichia, in „Biochemistry of Nucleic Acids", editat de K. Burton, London, Baltimore, Butterworths, 1974

Erlanger, B.F., Sachs, H., Brand, E.: J. Am. Chem. Soc., *76*, 1806, 1954

Erspamer, V., Bertaccini, G., Cei, J. M.: Experientia, *18*, 562, 1962 b

Erspamer, V., Anastasi, A.: Experientia, *18*, 58, 1962 a

Espejo, R. T., Canelo, E. S., Sinsheimer, R. L.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *63*, 1164, 1969

Etner, N., Doudoroff, M.: J. Biol. Chem., *196*, 853, 1952

Falconer, J. R.: *Mamalian Biochemistry*, J. A. Curchill Ltd, 1969

Fan, D. P., Higa, A., Levinthal, C.: J. Mol. Biol., *8*, 210, 1964

Fang, S., Anderson, K. M., Liao, S.: J. Biol. Chem., *244*, 6584, 1969

Faure, M.: Bull. Soc. Chim. Biol., *32*, 503, 1950

Faure, M., Morelec-Coulon, M. J.: C. R. Acad. Sci. Paris, *236*, 1104, 1953

Fawcett, C. H., Taylor, H. F., Wain, R. L., Wightman, F.: Proc. Roy. Soc. B., *148*, 543, 1958

Fellner, P., Ehresmann, C., Ebel, J. P.: Nature, *225*, 26, 1970

Fellner, P., Ebel, J. P.: Nature, *225*, 1131, 1970

Ferdman, D. L. :*Biokhimia*. Izdanie tretie, Moscova, Izd. Visşaia, şcola, 1966

Ferreira, S. H.: Biochem. Soc. Trans., 1189, 1974

Fiers, W., Sinsheimer, R. L.: J. Mol. Biol., *5*, 408, 424, 1962

Fieser, L. F., Fieser, M.: *Steroids*, New York, Reinhold Publ. Co., 1959

Fineberg, R. A., Greenberg, D. M.: J. Biol. Chem., *214*, 107, 1955

Fisher, D. B., Kirkwood R., Kaufman, S.: J. Biol. Chem., *247*, 5161, 1972

Florkin, M.: Arch. intern. physiol., *36*, 247, 1933

Flower, R. J.: Biochem. Soc. Trans., *2*, 1187, 1974

Folch, J., Wooley, D. W.: J. Biol. Chem., *142*, 963, 1942

Folch, J.: Federation Proc., *5*, 134, 1946

Folch, J.: J. Biol. Chem., *139*, 973, 1941

Forget, B. G., Weismann, S. M.: Science, *158*, 1965, 1967

Fougereau, M.: *Eléments d'immunologie fondamentales*. Paris, New York, Barcelone, Milan, Masson, 1977

Fox, C. F., Robinson, W. S., Haselkern, R., Weiss, S. B.: J. Biol. Chem., *259*, 186, 1964

Fraenkel-Conrat, H.., Williams, R. C.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *41*, 690, 1955

Fraenkel-Conrat, H., Singer, B.: Biochim. Biophys. Acta, *33*, 359, 1958

Franklin, R., Gosling, R. G.: Nature, *171*, 740, 1953

Frey-Wyssling, A., Mühlethaler, K.: *Ultrastructural plant cytology*. With an Introduction to molecular Biology. Amsterdam, New York, London, Elsevier Publ. Comp. 1965

Friedman, M., Byers, S. O., Rosenman, R. H., Elek, S.: Lancet, 464, 1971

Fukuda, M., Egamu, F.: Biochem. J., *123*, 407, 1971

Fuller, W., Hodgson, A.: Molecular Model-Building Studies of Transfer Ribonucleic Acid. in: „*Structure and Function of Transfer RNA and 5 S RNA*". editori Fröholm. L. O., Laland, S. G., New York, London, Academic Press, Oslo, Universitetforlaget pag. 75, 1968

Gale, E. F., Folkes, J. P.: Nature, *592*, 1955

Gale, E. F.: Sci. Amer., *195*, 42, 1956

Gale, E. F.: Recent Progress in Microbiology. 7th Internat. Congress of Mi-

crobiology, Stockholm, 1958, pag. 104, 1959

Gakina, I. N.: Pangamovaia kislota i eio primenenie, în „Vitamin B_{15}" Svoistva funcţii i primenenie", Moskva, „Nauka", 1965

Garrod, A. E.: *Inborn Errors of Metabolism.* 2nd Ed., London, Oxford University Press, 1973

Gentou, C.: C. R. Acad. Sci. Paris, *266*, 2358, 1968, *a*

Gentou, C., Yon, J., Filitti-Wurmser, S.: Bull. Soc. Chim. Biol., *50*, 2003, 1968 b

Gerritsen, T., Waisman, H. A.: New England: J. Med., *275*, 66, 1966

Gheţie, V., Micuşan, V.: *Analiza imunochimică.* Bucureşti, Editura Acad. R. S. România, 1966

Ghiretti-Magaldi, A., Nuzzulo C., Ghiretti, F.: Biochemistry, *2*, 445, 1963

Giovanelli, J., Stumpf, P. K.: J. Biol. Chem., *231*, 411, 1958

Glasscock, R. F., Heckstra, W. G.: Biochem. J., *72*, 673, 1959

Goetze, E. (edit.): *Fiziopatologie.* Bucureşti, Editura medicală, 1963

Goldstein, J., Bennet, T. P., Ceaig, L. C.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *51*, 119, 1964

Goldman, J., Carpenter, F. H.: Biochemistry, *13*, 4566, 1974

Goldfine, H., Bloch, K.: J. Biol. Chem., *236*, 2596, 1961

Goodfriend, T. L., Fyhrquist, F., Allmann, D.: Biochemical Effects of Angiotensin. în *Angiotensin*, editată de Page, I. H. Bumpus, F. M., Berlin, Heidelberg, New York, Springer Verlag, 1974 pag. 511

Goodman, H. M., Rich, A.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *48*, 2101, 1962

Goodwin, T. W.: *Recent advances in Biochemistry*, London, Churchill LTD, 1960

Goodwin, T. W.: (editor). *Cheimistry and biochemistry of plant pigments*, London, Academic Press, 1965

Goodwin, T. W.: *The biosynthesis of vitamins and related compounds.* New York, 1963

Goodman, H. M., Rich, A.: Proc. Natl. Acad. Sci., USA, *48*, 2102, 1962

Gordon, A. H., Martin, A. J. P., Synge, R. L. M.: Biochem. J., *37*, 79, 1943

Gordon, Y. E.: *Occurrence, classification, preparation and analysis of proteins*, în „Comprehensive Biochemistry", editat de M. Florkin and E. H. Stotz., vol. 7. Proteins, Amsterdam, London, New York, Elsevier Publishing Company, 1963, Part. I, pag. 1—53

Gottschalk, A. Historical introduction, în *Glycoproteins. Their composition, Structure and function* ed. 2-a, Amsterdam, London, New York, Elsevier Publ. Co, 1972, pag. 1—24.

Gottschalk, A.: Definition of glycoproteins and their delineation from other carbohydrate-protein compleres în *Glycoproteins. Their composition, structure and function.* ed. 2-a, Gottschalk, A editor, Amsterdam, London, New York, Elsevier Publ. Co, 1972, pag. 24—30

Gottschalk, A.: Occurrence and distribution of glycoproteins, în *Glycoproteins. Their composition, structure and function.* ed. 2-a, Gottschalk, A editor Amsterdam, London, New York, Elsevier Publ. Co, 1972, pag. 529—534

Gozariu, L., Ziegler, R. Minne, H., Pfeifer, E. F.: Stud. cerc. endocrinol., *22*, 357, 1971

Gozariu, L., Dascălu, R.: *Calciu în organismul uman. Fiziopatologie clinică*, Cluj-Napoca, Editura Dacia, 1975

Grace, N. H.: Can. J. Research, *17*, 247, 1939

Grads, C., Ballou, C. E.: J. Biol. Chem., *235*, 23, 1960

Graf, L., Cseh, G.: Acta Biochim. Biophys. Sci. Hung., *3*, 175, 1968

Graham, E. R. B.: „*Fetuin*", *Glycoproteins. Their composition structure and function*,

ed 2-a, Gottschalk, A., editor, Amsterdam, London, New York, Elsevier, Publ. Co., 1972, pag. 717—731

Granick, S.: J. Biol. Chem., *164*, 737, 1946

Green, D. W.: Special configuration in proteins, în „*Comprehensive Biochemistry*", editat de M. Florkin and E. H. Stotz, vol. 7, Proteins, Part 1, Amsterdam, London, New York, Elsevier Publishing Company, 1963, pag. 216, 266.

Greenberg, D. M.: *Metabolic Pathways*, vol. I, London, New York, Academic Press, 1967

Greenberg, J. R.: Nature *240*, 102, 1972

Greenberg, G. R.: Arch. Biochem., *19*, 337, 1948

Gregory, H., Hardy, P. M., Jones, D. S., Kenner, G. W., Sheppard, R. C.: Nature, *204*, 931, 1964

Gregory, R. A., Tracy, H. J.: Nature, *204*, 935, 1964

Grossman, M. I.: Gastroenterology, *67*, 738, 1974

Grosvenor, C., Mc Cann, S. M., Nallar, R.: Endocrinology, *76*, 883, 1965

Grove, J. F.: Quart. Rev., *15*, 56, 1961

Grunberg-Manago, M., Ortiz, P. J., Ochoa, S.: Biochim. Biophys. Acta, *20*, 269, 1956

Guest, J. R., Yanofsky, C.: Nature, *210*, 799, 1966

Gusev, A. I., Yazova, A. K.: Biokhimia, *35*, 172, 1970

Gutte, B., Merrifield, R. B.: J. Am. Chem. Soc., *91*, 501, 1969

Haines, T. H., Pousada, M., Stern, B., Mayers, G. L.: Biochem. J., *113*, 585 1969

Haines, T. H.: în „The Halogenated Sulphatides", în „*Biochemistry of Lipids*", T. W. Goodwin editor, p. 272, Londra, Butterworths, 1974

Hales, C. N., Randle, P. J.: Lancet, *1*, 790, 1963

Hall, B. D., Spiegelman, S.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *47*, 137, 1961

Hamberg, M., Samuelson, B.: J. Am Chem. Soc., *88*, 2349, 1966

Hamilton, T. H., Widnell, C. C., Tata, J. R.: J. Biol. Chem., *243*, 408 (1968)

Hanahan, D. J.: J. Biol. Chem. , *211*, 313, 321, 1954

Hanahan, D. J.: Federation Proc., *16*, 826, 1957

Hanahan, D. J., Brockerhoff, H.: Arch. Biochem. Biophys., *91*, 326, 1960

Hand, R.: J. Cell. Biol., *67*, 761, 1975

Hansky, J., Soveny, C., Korman, M. G.: Gastroenterology, *61*, 62, 1971

Harborne, T. B.: *Biochemistry of phenolic compounds.*, London, New York, Academic Press, 1964

Hart, L. I., Bray, R. C.: Biochim. Biophys. Acta, *146*, 611, 1967

Hartman, P. E., Suskind, S. R.: *Gene action*. New Jersey, Prentice-Halle Inc., USA, 1965

Harris, R. S., Wool, T. A., Loraine, (editori), *Vitamins and hormones*, vol. 22, New York, London, Academic Press, 1964

Harris, J. I., Work, T. S.: Biochem. J., *46*, 582, 1960

Haslewood, G. A.: D.: Examples of vertebrate evolution as indicated by bile salt types and by general morphology, în *Biochemical Evolution and the Origin of Life*, editată de E. Schoffeniels, vol. II, North-Holland Publishing Co. 1971, pag. 191

Haurovitz, F.: Chemistry and Biology of Proteins, 1950

Hayashi, M., Hayashi, M. N., Spiegelman, S: Science, *140*, 1313, 1963

Hayashi, M., Hayashi, M. N., Spiegelman, S.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *50*, 664, 1963

Hawthorne, J. N., Hübscher, G.: Biochem. J., *72*, 10 P, 1959

Hawthorne, J. N.: Vitamins and Hormones, *22*, 57, 1964

Helwig, H. L., Greenberg, D. M.: J. Biol. Chem., *198*, 703, 1952

Hemming, F. W.: Lipids in Glycan Biosynthesis, în „*Biochemistry of Lipids*", T. W. Goodwin, editor, Londra, Butterworths, 1974, p. 39

Henderson, J. H. M., Graham, H. D.: Nature, *193*, 1055, 1962
Hermon-Taylor, J.: Gastroenterology, *55*, 488, 1968
Hers, H. G.: Biochem. J., *86*, 11, 1963
Hesin, R. B.: Uspekhii sovrem. biol., *74*, 171, 1972
Hinman, J. W.: Ann. Rev. Biochem., *41*, 161, 1972
Hirsch, J., Ahrens, E. H.: J. Biol. Chem., *233*, 311, 1958
Hirschmann, R., Nutt, R. F., Veber, D. F., Vitali, R. A., Varga, S. L., Jacob, T. Holly, F. W., Denkewalter, R. G.: J. Am. Chem. Soc., *91*, 507, 1969
Ho, R—J., Sutherland, E. W.; J. Biol. Chem., *246*, 6822, 1971
Hoagland, M. B., Stephenson, M. L., Scott, J. F., Hecht, L. I., Zamecnik, P. C.: J. Biol. Chem., *231*, 241, 1958
Hokin, L. E., Hokin, M. R.: J. Biol. Chem., *233*, 800, 1958
Hokin, L. E., Hokin, M. R.: J. Biol. Chem., *233*, 818, 1958
Hokin, L. E., Hokin, M. R.: J. Biol. Chem., *234*, 1381, 1959
Holick, M. F., Schnoes, H. K., De Luca, H. F.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *68*, 803, 1971
Holick, M. F., Garabedian, M., De Luca, H. E.: Biochemistry, *11*, 2715, 1972 a
Holick, M. F., Garabedian, M., De Luca, H. F.: Science, *176*, 1247, 1972 b
Holick, M. F., Schnoes, H. K., De Luca H. F., Gray, R. W., Boyle, J. T., Suda, T.: Biochemistry, *11*, 4251, 1972 c
Holick, M. F., Semmeler, E. J., Schnoes, H. K., De Luca, H. F.: Science, *180*, 190, 1973 a
Holick, M. F., Semmler, E. J., Schnoes, H. K., De Luca, H. F.: Science, *180*, 190, 1973 b
Holum, J. R. *Elements of General and Biological Chemistry. An Introduction to the Molecular Basis of Life*, New York, London, John Wiley and Sons Inc., 1962
Holley, R. W., Apgar, J., Everett, G. A., Madison, J. T., Marquisee, M., Merill, S. H. Penswick, J. R., Zamir, A.: Science, *147*, 1462, 1965
Holmgren, A.: Eur. J. Biochem., *6*, 475, 1968
Hoof, van F, Hers, H. G.: Eur. J. Biochem., *2*, 265, 1967
Horn, D. H. S. Fabri, S., Hampshire, F., Lowe, M. E.: Biochem. J., *109*, 399, 1968
Horecker, B. L., Smyrniotis, P—Z.: Biochim. Biophys. Acta *12*, 98, 1953
Horowitz, N. H., Leupold, U.: Cold Spring Harbor Symposia on Quant. Biol. *16*, 1951
Hortone, E. W.: Experientia, *21*, 113, 1965
Hruby, V. J., Smith, C. W., Bower, A., Hadley, M. E.: Science, *176*, 1331, 1972
Hübscher, G., Clark, B.: Biochem. J., *72*, 7P, 1959
Hunter, P. E., Schwartz, L. S.: in *„Mekhanism deistvia antibiotikov"* Moskva, Izd Mir, 1969
Hurwitz, J, Bresler, A., Diringer, R.: Biochem. Biophys. Res. Commun., *3*, 15, 1960
Hurwitz, J., Furth, J. J., Anders, M., Ortiz, P. J., August, J. T.: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., *26*, 91, 1961
Van Hoof, F.: Eur. J. Biochem., *2*, 271, 1967
Idler, D. R., Fagerlund, U. H. M.: J. Am. Chem. Soc., 77, 4142, 1955
Illingworth, B., Cori, G. T.: J. Biol. Chem., *218*, 123, 1956
Ilyn, V. S., Titova, G. V.: Biokhimia, *30*, 1251, 1965
Imura, N., Weiss, G. B., Chambers, R. W.: Nature, *222*, 1147, 1969
Ingold, C. K., Prelog, V., Cohn, R. S.: Angew. Chem., *5*, 385, 1966
Ingram, V. M.: Nature, *178*, 792, 1956

Ingraham, L. L.: *Biochemical Mechanisms.* New York, London, John Wiley and Sons Co., 1962

Ingram, V. M.: *Biosynthesis of macromolecules.* Second Edition, W. A. Benjamin Inc., California, 1972

Kalu, D. N., Hadji-Georgopoulos, A., Sarr, M. G., Solomon, B. A., Foster, G. V.: Endocrinology, *95*, 1156, 1974

Kanegasaki, S., Wright, A.: Proc. Natl Acad. Sci. USA, *67*, 951, 1970

Karlson, P.: Angew. Chem., *75*, 257, 1963

Karlson, P.: *Scurt manual de biochimie pentru medici și naturaliști*, București, Editura medicală, 1967

Karnovsky, M. L., Wallach, D. F. H.: J. Biol. Chem., *236*, 1895, 1961

Kass, L. R., Bloch, K.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *58*, 1168, 1967

Kotsoyannis, P. G., Tometsko, A., Fukuda, K.: J. Am. Chem. Soc., *85*, 2863, 1963

Keda, Yu, M., Kolli, E. A., Kushka, F. Yu., Sinitsina, A. L., Hahlov, A. S.: Biokhimia, *33*, 852, 1968

Kelly, J., Ambler, R. P.: Biochem. Soc. Trans., *1*, 164, 1973

Kendrew, J. C.: Nature, *185*, 422, 1960

Kennedy, E. P., Borkenghagen, L. F. Smith, S. W.: J. Biol. Chem., *234*, 1998, 1959

Keutmann, H. T., Dawson, B. F., Aurbach, G. D., Potts, J. T. jr.: Biochemistry, *11*, 1973, 1972

Kim, S. H., Quigley, G. T., Suddath, F. L., Mc. Pherson A., Sneden D., Kim, J. J., Weinzierl, J., Rich, A.: Science, *179*, 285, 1973

Klenk, E.: Hoppe-Seyler's Zeit. Physiol. Chem., *192*, 217, 1930

Klotz, I., Klotz, T. A., Fiess, H. A.: Arch. Biochem. Biophys., *68*, 284, 1957

Klotz, I., Keresztes-Nay, S.: Biochemistry, *2*, 445, 1963

Knoop, F.: Beitr. Chem. Physiol. Path., *6*, 150, 1904

Kodicek, E., Lawson, D.E.M., Wilson, P. W.: Nature, *228*, 763, 1970

Koechlin, B. A.: J. Am. Chem. Soc., *74*, 2649, 1952

Kokas, E.: Gastroenterology, *67*, 750, 1974

Kokas, E., Johnston. C. L.: Am. J. Physiol., *208*, 1196, 1965

Kolotilova, A. I.: *Obmen veșcestv.* Izd. Leningradscovo Universiteta, 1962

Kornberg, A., Lehman, I. R., Bessman, M. J., Simms, E. S.: Biochim. Biophys. Acta, *21*, 197, 1956

Kornberg, A.: Science, *131*, 1503, 1960

Krakow, J. S., Ochoa, S.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *49*, 88, 1963

Krebs, H. A., Kornberg, A.: *Energy transformation in living matter a survey.* Göttingen, Heidelberg, Springer Verlag, 1957

Kubota, T., Tokoroyama, T., Tsukuda, Y., Koyama, H.: Science, *179*, 400, 1973

Kung, Y., Du. Y., Huang, W., Chen, L.: Sci Sinica (Peking), *14*, 1710, 1965

Langerkvist, U.: An Enzyme-Substrate Complex between Valyl-Ribonucleic Acid Synthetase and Ribonucleic Acid Specific for Valine, în *„Structure and Function of Transfer RNA and 5 S RNA"*, editori Fröholm, L. O., Laland, S. G., New York, Universitetforlaget, Oslo, Academic Press, 1968 p. 143

Landolt, R., Astwood, E. B.: Am. J. Physiol., *200*, 841, 1961

Latham, M. C.: *Nutrition humaine en Afrique Tropicale*, Roma, F.A.O., 1970

Lavtchjan, E. K., Kevorkova, L. V.: Izv. Akad Nauk. Arm. SSSR., *XVI*, 75, 1963

Lazaris, Ya, A., Lapin, V. I., Pal'mina, T. V.: Vopr. med. khimii, *17*, 625, 1971

Di Lauro, R., Metafora, S., Gonsiglio, E., Gentile, G., Varrone, S.: J. Biol. Chem., *250*, 3267, 1975

Lederberg, J.: Genetics, *32*, 505, 1947

Lederer, E., Lederer, M.: în *„Comprehensive Biochemistry"*, editată de M. Forkin, și E. H. Stotz, vol. 4, *Separation Methods*, Amsterdam, London, New York, p. 32, 1962

Lee, T. H., Lerner, A. B., Buettner-Janusch, V.: Biochim. Biophys. Acta, *71*, 706, 1963

Lee, T. H., Lerner, A. B., Buettner-Janusch, V.: J. Am. Chem. Soc., *81*, 6084, 1959

Lefkowitz, R. J., Roth, J., Pastan, I.: Nature, *228*, 864, 1970

Lehninger, A. L. *The Mitochondrion. Molecular basis of structure and function.* New York, Amsterdam, W. A. Benjamin Inc., 1964

Lehninger, A.: *Biochemistry. The molecular basis of cell structure and function.* Worth Publishers, Inc. 1978

Leites, S. M., Davtyan, N. K.: Vopr. Med. khim., *11*, 49, 1965

Lemonnier, A.: Les principaux aspects du métabolisme de la tyrosine et de son exploration, în *„Problemes actuels de biochimie appliquée"*, 3eme série, Paris, Masson et Cie, 1970, p. 130

Liengyel, P., Speyer, J. F., Ochoa, S.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *47*, 1936, 1961

Lennarz, W. J., Light, R. J., Bloch, K.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *48*, 840, 1962

Lengyel, P., Speyer, J. P., Basilio, C., Ochoa, S.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *48*, 282, 1962

Levene, P. A.: *Hexosamines and Mucoproteins*, London, Longmans, Green and Co., 1925

Lewin, B. M.: Citat după Brownlee, G. G., (1979).

Lezius, A.: Biochem. Z., *336*, 510, 1963

Lewis, G. M., Stewart, K. M., Spencer-Peet, J.: Biochem. J., *84*, 115P, 1962

Li, Ch. H., Dixon, J. S., Chung, D.: J. Am. Chem. Soc., *80*, 2587, 1958

Li, Ch. H., Barnafi, L., Chrétien, M., Chung, D.: Nature, *208*, 1093, 1965

Li, Ch., H., Gráf., L.: Proc. Natl. Acad. Sici. USA, *71*, 1197, 1974

Liao, S., Barton, R. W., Lin, A. H.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *55*, 1593, 1966

Libby, P. R.: Biochem. J., *130*, 663, 1972

Lipscomb, W. N., Coppola, J. C., Hartsuck, J. A., Ludwig, M. L., Muirhead, H., Seral, J., Steitz, J. A.: J. Mol. Biol., *19*, 423, 1966

Little, H. N., Bloch, K.: J. Biol. Chem., *183*, 33, 1950

Loftfield, R. B., Eigner, E. A.: J. Biol. Chem., *231*, 925, 1958

Longsworth, L. G., Cannan, R. K., Mac Innes, D. A.: J. Am. Chem. Soc., *62*, 2580, 1940

Lapez, E., White, J. E., Engel, F. L.: J. Biol. Chem., *234*, 2254, 1959

Lowe, W. E.: Biochim. Biophys. Acta, *23*, 465, 1957

Lowry, P. J., Bennett, H. P. J., Mc Martin, C., Scott, A. P.: Biochem. J., *141*, 427, 1974

Lowry, P. J., Chadwick, A.: Biochem. J., *118*, 713, 1970

De Luca, H., Gran, F., Steenbock. H.: J. Biol. Chem., *224*, 201, 1957 a

De Luca, H., Steenbock, H.: Science, *126*, 258, 1957 b

De Luca, I., Rosso, G., Wolf, G.: Biochem. Biophys. Res. Communn., *41*, 615, 1970 *a*

De Luca. L., Schumacker, M., Wolf, G.: J. Biol. Chem., *245*, 4551, 1970 *b*

De Luca, L., Maestry, N., Rosso, G., Wolf, G.: J . Biol. Chem., *248*, 641, 1972

Luft, R., Gerasi, E.: Lancet, *2*, 124, 1964

Lynen, F., Eggerer, H., Henning, U., Kessel, I.: Angew. Chem., *70*, 738, 1958

Lynen, F., *Biochemische Strukturen in der lebendigen Substanz*. München, Jahrbuch der Max Plank Gesellschaft zur förderung der Wissenschaftler E.V.S., *47*, 1969

Mac Gregor, R. R., Chu, L., Hamilton, J. W., Chon, D. V.: Endocrinology, *93*, 1387, 1973

Mac Leod, A. M., Millar, A. S.: J. Inst. Brew., *LXVIII*, 321, 1962

Macey, A., Stowell, K. C.: J. Inst. Brew., *LXVII*, 396, 1961

Mc Farlane, E. S., Fraser, M. J.: Biochem. Biophys. Res. Comm., *15*, 351, 1964

Mainwaring, W. I. P., Irving, R.: Biochem. J., *118*, 12 P, 1970

Mainwaring, W. I. P.: J. Endocrin., *45*, 531, 1969

McMurray, W. C., Strickland, K. P., Berry, J. P., Rossiter, R. J.: Biochem. J., *66*, 634, 1957

Mc Murray, W. C., Berry, J. F., Rossiter, R. J.: Biochem. J., *66*, 629, 1957

Mahler, R.: Biochemical Disorders in Human Disease, edit. by R.H.S. Thompson, I.D.P. Wootton, 3rd ed., J. A. Churchill, 1970

Mansour, T. E., Sutherland, E.W., Rall, T. W., Bueding, E.: J. Biol., Chem., *235*, 466, 1960

Manta, I.: Biochimie medicală, București, Ed. didactică și pedagogică, 1968

Manta, I.: Cucuianu, M., Benga, G., Hodârnău, A.: Metode biochimice în laboratorul clinic, Cluj-Napoca, Ed. Dacia, 1976

Manskaya, S. M., Kodina, L. A.: DAN SSSR, *123*, 733, 1958

March, R. S., La vitamine „D" et les facteurs hypercalcemiants, Skira, Gest. 1948

Marcker, K. A., Dube, S. K., Clark, B.F.C.: Structure and Function of Transfer RNA and 5S RNA, Fröholm, L. O., and Laland, S. G., edts, New York, London, Academic Press, Universitetforlaget, Oslo, 1968, p. 53—64

Mardashev, S. R.: Moskva, „Meditzyna", 1975

Marinetti, G. V., Erbland, J., Stotz, E.: J. Biol. Chem., *233*, 562, 1958

Marshak, A., Calvet, F.: J. Cell. Comp. Physiol., *34*, 451, 1949

Martin, A. J. P., Synge, R.L.M.: Biochem. J., *35*, 1358, 1941

Martin, R. G., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., *28*, 357, 1963

Martius, C.: Biochem Z., *26*, 326, 1954,

Martius, C.: Schweitz. med. Wschr., *92*, 1264, 1963

Mathieu, H., Grisinier-Gleizes P., Thomasset, M.: C. r. Acad. Sci. *278*, 2855, 1974

Matsubara, H., Smith, E. L.: J.Biol. Chem., *237*, PC 3575, 1962

Matsumura, S., Stumpf, P. K.:Arch. Biochem. Biophys., *125*, 932, 1968

Mattson, F. H., Bech, L. W.: J. Biol. Chem., *214*, 115, 1955

Maximilian, C.: St. cerc. endocrinol., *23* (3), 197, 1972

Maxwell, E. S.: Proc. Natl. Acad. Sci. US, *48*, 1639, 1962

Mayers, G. L. Haines, T. H.: Biochemistry, *6*, 1965, 1969 *a*

Mayers, G. L., Pousada, M., Haines, T. H., Biochemistry: *8*, 2981. 1969 *b*

Means, A. R., Hamilton, T. H.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *56*, 686, 1966

Meienhofer, J., Schnabel, E., Bremer, H., Brinkhoff, O., Zabel, R., Snoka, W., Klovstermeyer, H., Brandenburg, D., Okuda, T., Zahn, H.: Z. Naturforsch., *18 b*, 1120, 1963

Meister, A.: *Biochemistry of the amino acids*, New York, Academic Press Inc., 1957

Meister, A.: Advances in Enzymol., *31*, 183, 1968

Mellamby, J. M.: J. Physiol., *61*, 419, 1926

Mellamby, J. M.: J. Physiol., *60*, 75, 1925

Merrifield, R. B.: Science, *150*, 178 1965

Meselson, M., Stahl, F. W.: Proc. Natl. Acad. Sci USA, *44*, 671, 1958

Metzenberg, R. L., Hall, L. M., Marshall, M., Cohen, P. P.: J. Biol. Chem., *229*, 1019, 1957

Mialhe, P., Krug, E., Gross, R., Desbals, P.: *Hormones et régulation mé-*

taboliques, Paris, Masson et Cie, 1973 pag. 289—290

Mikhlin, D.M.: *Biologiceskoe okislenie*. Izd. Akademii Nauk SSSR, Moskva, 1956

Mildvan, A. S., Cohn, M.: Biochemistry, *2*, 910, 1963

Milne, M. D., *„Biochemical Disordes in Human Disease"* edit. by R.H.S. Thompson, L. D. P. Wootton, Third ad. London, J. A., Churchill, 1970

Miroky, A. E., Osawa, S., Allfrey, V. G.: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., *21*, 49, 1956

Mislow, K.: J. Am. Chem. Soc., *74*, 5155

Monod, J., Changeux, J. P., Jacob, F.: J. Mol. Biol., *6*, 306, 1963

Monod, J., Jacob, F., Gros, F.: Biochem. Soc. Symp., *21*, 104, 1961

Moore, B. C.: Proc. Natl. Acad. Sci., USA, *50*, 1018, 1963

Montenecourt, B. S., Langsam, M. E., Dubin, D. T.: J. Cell. Biol., *46*, 245, 1970

Montgomery, R., Dryer, R. L., Conway, T. W., Spector, A. A. Biochemistry. C. V Mosby Company, Saint Louis, 1974

Montreuil, J., Biserte, G., Mullet, S., Spik, G., Leroy, N.: C. R. Acad. Sci., Paris, *252*, 4065, 1961

Moraru, I., Antohi, S.: *Introducere în genetica moleculară*, ediția a II-a, București, Editura Medicală, 1966

Morgan, E. H.: J. Biol. Chem., *244*, 4193 1969

Morgan, E. H.: Appleton, T. C.: Nature (Lodon), *223*, 1371, 1969

Morrell, A. G., Gregoriadis, G., Scheinberg, I. H., Hickman, J., Ashwell, G.: J. Biol. Chem., *246*, 1461, 1971

Mueller, K., Bremer, H.: J. Mol. Biol., *38*, 329, 1968

Mueller, G. C.: Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol., *28*, 1780, 1969

Mc Murray, W. C., Mohyuddin, F.: Lancet, *2*, 352. 1964

Mc Murray, W. C., Mohyuddin, F., Rossiter, R. J., Rathbun, J. C., Valentine, G. H., Koegler, S. J., Zafras, D. E.: Lancet, *1*, 138, 1962

Nair, R. M. G., Kastin, A. J., Schally, A. V.: Biochem. and Biophys. Res. Communs., *43*, 1376, 1971

Nakamoto, T., Weiss, S. B.: Proc. Natl. Acad. Sci., *48*, 880, 1962

Nasset, E. S.: Gastroenterology, *67*, 744, 1974

Neher, R., Riniker, B., Rittel, W., Zuber, H.: Helv. chim. Acta, *51*, 1900, 1968

Nenițescu, C. D.: *Chimie organică*, Ediția a 6-a, vol. II, București, Editura didactică și pedagogică, 1968, pag. 739—749

Nesmeyanov, A. N., Nesmeyanov, N. A.: *Naciala organiceskoi khimii*, Izd. vtoroe, Moskva, Izd. Khimia, 1974

Ng, K. K. F., Vane, J. R.: Nature, *216*, 762, 1967

Ng, K. K. F., Vane, J. R.: Nature, *218*, 144, 1968

Ng, K.K.F., Vane, J. R.: Nature, *225*, 1142, 1970

Nirenberg, M. W., Matthaei, J. H.; Proc. Natl. Acad. Sci., USA, *47*, 1580; 1588, 1961

Nirenberg, M. W., Matthaei, J. H.: Proc. Natl. Acad. Sci., USA, *47*, 1588 1961

Neurath, H., Bailey, K.: *The Proteins. Chemistry, Biological Activity and Methods*, Vol. II, Part A and B, New York, Academic Press Inc., 1953—1954

Nishimura, S.: *„Biochemistry of Nucleic Acids"* Edited by K. Burton, London, Baltimore, Butterworths, 1974

Noe, B. D., Bauer, G. E.: Endocrinology, 89, 642—651, 1971

Nordin, B.E.C.: *Osteomalazie and Osteoporose*, în „Documenta Geigy" Basel, Acta clinica, *2*., 1963

Norris, A. T., Bloch, K.: J. Biol. Chem., *238*, PC 3133, 1963

Norris, A. T., Matsumura, S., Bloch, K.: J. Biol. Chem., *239*, 3653, 1964

Novelli, G. D.: Ann. Rev. Biochem., *36*, 449, 1967

Nugteren, D. H., van Dorp, D. A., Bergström, S., Hamberg, M.,

Samuelsson, B.: Nature, *212*, 38 1966

Nunez, J., Mauchamp, J., Macchia, V., Roche, J.: C. R. Acad. Sci., 260, 331, 1965

Nunez, E., Savu, L., Engelmann, F., Benassayag, C., Crepy, O., Jayle, M. F.: C. R. Acad. Sci., Paris, *273*, 242, 1971 a

Nunez, E., Engelmann, F., Benassayag, C., Savu, L., Crepy, O., Yayle, M. F.: C. R. Acad. Sci., Paris, *272*, 2396, 1971 c

Nunez, E., Engelmann, F., Benassayag, C., Yayle, M. F.: C. R. Acad. Sci., Paris, *273*, 831, 1971 b

Nuță, Gh., Bușneag, C.: *Investigații biochimice*, București, Editura Didactică și Pedagogică, 1977

Ochoa, S., Burma, D. P., Kröger, H., Weill, J. D.: Biochemistry, *47*, 670, 1961

Ochoa, S.: Experientia, *20*, 57, 1964

Ochoa, M., Weinstein, J. B.: Proc. Natl. Acad. Sci., USA, *52*, 470, 1964

Ogawa, Y.: Bot. Mag., Tokyo, *80*, 27, 1967

Ogawa, Y., Imamura, S-I.: Memoirs of the College of Agriculture Kyoto University, *90*, 27, 1966

Ohnishi, M., Urry, D. W.: Biochem. Biophys. Res. Communn., *36*, 194, 1969

Ohno, S., *Evolution by gene duplications*, New York, Heidelberg, Berlin, Springer Verlag. 1970, pag. 160.

Ohtaka, Y., Spiegelman, S.: Science, *142*, 493, 1963

Olson, J. A., Anfinsen, C. B.: J. Biol. Chem., *202*, 841, 1953

O'Malley, B. W., Spelsberg, Thomas, C., Schrader, W. T., Chytil, F., Steggles, A. W.: Nature, *235*, 141, 1972

O'Malley, B. W., Toft, D. O., Sherman, M. R.: J. Biol. Chem., *246*, 1117, 1971

Ondetti, M. A., Narayanan, V. L., von Saltza, M., Sheehan, J. T., Sabo, E. F., Bodanszky, M.: J. Amer. Chem. Soc., *90*, 4711 1968

Opreanu, P. Zenobia: *Contribuțiuni la studiul sintezei acidului uric la păsări*, București, 1936

Osaki, S., Johnson, D. A., Frieden, E.: J. Biol. Chem., *241*, 2746, 1966

Osborn, M.: J.: Ann. Rev. Biochem., *38*, 501, 1969

Page, I. H.: *Angiotensin*, edited by Page I. H., Bumpus, F. M., Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, 1974, pag. 518—519

Page, I. H., Bumpus, F. M.: Physiol. Rev., *41*, 331, 1961

Pake, G. E.: *Paramagnetic Resonance*, New York, W. E. Benjamin, 1962

Paleg, L. G., Coombe, B. G., Buttrose, M. S.: Plant. Physiol., *37*, 798, 1962

Papkoff, H., în *Structure-Activity Relationships of Protein and Polypeptide-Hormones* Université de Liège, 1971, pag. 73—79

Parhon, C., Goldstein, M.: *Les sécrétion internes (Pathologie et physiologie)*, Paris, A. Maloine, Ed. 1909

Parisi, A. F., Vallee, B. L.: Biochemistry, *9*, 2421, 1970

Parodi, A. J., Behrens, N. H., Leloir, L. F., Carminatti: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1972, *a*

Parodi, A. J., Behrens, N. H., Leloir, L. F., Dankert, M.: Biochim. Biophys. Acta, 1972 *b*

Parsons, J. A., Reit, B., Robinson, C. J.: Endocrinology, *92*, 454, 1973

Pauling, L., Itano, H. A., Singer, S. J., Wells, I. C: Science, *110*, 543, 1949

Pavel, I., Pieptea, R., *Diabetul*, București, Editura Medicală, 1965

Pavel, I., Sdrobici, D., Pieptea, R.: *Diabetul zaharat*, București, Editura, Academiei RSR, 1974

Payne, J. W., Jakes, R., Hartley, B. S.: Biochem. J., *117*, 757, 1970

Pelkonen, R., Kivirikko, K. I.: New Engl. J. Med., *283*, 451, 1970

Penman, S., Scherrer, K., Becker, Y., Darnell, J. E.: Proc. Natl. Acad. Sci., USA, *49*, 654, 1963

Perutz, M. F.: *Proteins and nucleic acids*, Amsterdam, Elsevier Publishing Company, 1962

Perutz, M. F.: J. Mol. Biol., *13*, 646, 1965

Petermann, M. L.: *The physical and chemical properties of ribosomes*, Amsterdam, London, New York, Elsevier publishing comp., 1964

Pettigrew, G. W., Leaver, J. L., Meyer, T. E., Ryle, A. P.: Biochem. J., *147*, 291, 1975

Pigman, W., Horton, D., (Editors): *The Carbohydrates. Chemistry and Biochemistry.* Second Edition, New York, London, Academic Press, Vol. IA, IIA, IIB, 1972, 1970 , 1970

Pikó, L., Blair, D. G., Tyler, A., Vinograd, J.: Proc. Natl. Acad. Sci., USA, *59*, 830, 1968

Plattner, P.A., Vogler, K., Studer, R. O., Quitt, P., Keller-Schierlein, W.: Helv. Chim. Acta, *46*, 927, 1963

Polonovski, M., *Biochimie medicale.* 8ème édition, Paris, Masson Cie, 1967

Pollister, A. W., Mirky, A. E.: J. Gen. Physiol., *30*, 101, 1946 Pont Lezica, R.: Biochem. Soc. Trans., *7*, 334, 1979.

Popjak, G., Cornforth, J. W.: Adv. Enz., *22*, 281, 1960

Porter, R. R., Sanger, F.: Biochem. J., *42*, 287, 1948

Porter, H., *The Biochemistry of Copper*, Edit. by Peisach. J., Aisen, P., Blumberg, W. E., Academic Press, New York, 1966, pag. 159

Potts, J. T. Jr., Nial, H. D., Kautmann, H. T., Brewer, H. B. Jr., Deffos L. J.: Proc. Natl. Acad. Sci., *59*, 1321, 1968

Poulik, M. D.: Ann. N. Y. Acad. Sci., *151*, 476, 1968

Powell, W. S., Hammarström, S., Samuelsson, B.: Europ. J. Biochem., *41*, 103, 1974 a

Powell, W. S., Hammarström, S., Samuelsson, B.: Lancet, *1*, 1120, 1974 b

Poyser, N. L.: Biochem. Soc. Trans., *2*, 1196, 1974

Quitt, P., Stander, R. O., Vogler, K.: Helv. Chim. Acta, *46*, 1715, 1963

Radley, M.: Annals of Botany, N. S., XXII, *87*, 297, 1958

Raicu, P.: *Genetica*, București, Editura Didactică și Pedagogică, 1974

Rafelson, M. E., Binkley, S. B.: *Basic Biochemistry.* Second Edition. New York, London, The Macmillan Company, 1968

Randle, P. J., Garland, P. B., Hales, C. N., Newsholme, E. A.: Lancet, *1*, 785, 1963

Rasmusen, H. și alții: J. Clin. Invest., *42*, 1940, 1963

Rasmussen, H., Sze, Y. L., Young, R.: J. Biol. Chem., *239*, 2852, 1964

Ratner, S., Petrack, B., Rochovansky, O.: J. Biol. Chem., *204*, 95, 1953

Ratner, S., Parker, Anslow, W., Petrack, B.: J. Biol. Chem., *204*, 115, 1953

Ratner, S., Petrack, B.: Arch. Biochem., *65*, 582, 1956

Razafimahaleo, E., Frenoy, J. P., Bourrillon, R.: C. R. Acad. Sci. Paris, *269*, 1567, 1969

Rees, H. H., Goodwin, T. W.: Biochem. Soc. Trans., *2*, 1027, 1974

Reichman, M. E.: Proc. Natl. Acad. Sci., USA, *52*, 1009, 1964

Rickli, E. E., Edsall, J. T.: J. Biol. Chem., *237*, 258 PC, 1962

Robbins, P. W., Bray, D., Dankert, M., Wright, A.: Science, *158*, 1536, 1967

Robbins, P. W.: Biochem. Soc. Trans., *7*, 320, 1979.

De Robertis, E.D.P., Novinski, W. W., Saez, F. A.: *Cell Biology.* Fourth Edition of general Cytology. Philadelphia, London, W. B. Sanders Company, 1965

Robinson, F. A.: *Vitamin co-Factors of enzime systems.* Oxford, London, Edinburgh, New York, Pergamon Press, 1966

Roncari, D.A.K., Bradshaw, R. A., Vagelos, P. R.: J. Biol. Chem., *247*, 6234, 1972

Roos, V. A., Okano, K., Deftos, L. J.: Biochem. and Biophys. Res. Communs., *60*, 1134, 1974

Rosset, R., Monier, R., Julien, J.: Bull. Soc. Chim. Biol., *46*, 87, 1964

Roth, J., Pastan, I., Lefkowitz, R. J., Pricer, W. E., Freychet, P. Neville, D. M. Jr.: in *Structure-Activity Relationships of Protein and Polypeptide Hormones*, Université de Liège, 1971, pag. 228—237

Rubenstein, A. H., Clark, J. L., Melani, F., Steiner, D. F.: Nature, *224*, 697, 1969

Rudman, D.: in *Peptides: Chemistry and Biochemistry*, Weinstein, B., (editor), Marcel Dekker Inc., New York, 1970, pag. 191

Rudman, D., Delhio, A. E., Garcia, L. A., Barnett, J., Howard, C. H., Walker, W., Moore, G.: Biochemistry, *9*, 99, 1970

Russell, J. H., Geller, D. M.: J. Biol. Chem., *250*, 3409, 1975

Ruttenberg, M. A., King, T. P., Craig, L. C.: Biochemistry, *5*, 2857, 1966

Ruzicka, L., Stoll, M.: Helv. Chim. Acta, 5, 929, 1922

Ruzicka, L.: Experientia, *9*, 359, 1953

Ryszka, F. J., Khokhlov, A. S.: Biokhimia, *30*, 1277, 1965

Ryle, A. P., Sanger, F., Smith, L. F., Kitai, R.: Biochem. J., *60*, 541, 1955

Ryle, A. P., Sanger, F.: Biochem. J., *60*, 535, 1955

Said, S. I.: Gastroenterology, *67*, 735, 1974

Said, S. I., Mutt, V.: Science, *169*, 1217, 1970

Salabé, G. B., Robins, J.: Biochem. Biophys. Acta, *214*, 198, 1970

Salen, G., Dryszka, H., Chen, T., Saltzman, W.H., Mosbach, E.H.: Lancet, *2*, 1517, 1974

Samuelson, B.: J. Amer. Chem. Soc., *87*, 3011, 1965, b

Sanger, F., Brownlee, G. C., Barrell, B. G.: in *Structure and Function of Transfer RNA and 5S-RNA*, Fröholm, L. O., Laland, S. G., London, New York, Universitetsforlaget, Oslo, Academic Press, 1968, pag. 1—16

Sanger, F.: Biochem. J., *39*, 507, 1945

Sanger, F.: Biochem. J., *45*, 563, 1949

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R.: Proc. Natl. Acad. Sci., USA., *74*, 5463, 1978

Sar, M., Liao, S., Stumpf, W. E.: Endocrinology, *86*, 1088, 1970

Sar, M., Stumpf, W. E.: Science, *179*, 389, 1973

Sasaki, H., Foloona, G. R., Unger, R. H.: Gastroenterology, *67*, 746, 1974

Saunders, M., Wishina, A., Kirkwood, J.: J. Amer. Chem. Soc., *79*, 3289, 1957

Saunders, G. F., Shirakawa, S., Saunders, P. P., Arrighi, F. E., Hsu, T. C.: J. Mol. Biol., *63*, 323, 1972

Saxena, B. B., Rathnam, P.: *Structure-Activity Relationships of Protein and Polypeptide Hormones*, Université de Liège, 1971, pag. 122—131

Schally, A. V., Saffran, B., Zimmerman, B.: Biochem. J., *70*, 97, 1958

Schally, A. V., Bowers, C. Y., Redding, T. W., Barrett, J. F.: Biochem. Biophys. Res. Communs, *25*, 165, 1966

Schally, A. V., Sawano, S., Arimura, A., Barrett, J., Wakabayashi, I., Bowers, C. Y.: Endocrinology, *84*, 1493, 1969

Schally-, A. V., Baba, Y., Nair, R.M.G., Bennett, E.: J. Biol. Chem., *246*, 6647, 1971 a

Schally, A. V., Nair, R.M.G., Redding, T. W., Arimura, A.: J. Biol. Chem., *246*, 7230, 1971 b

Schally, A. V., Arimura, A., Kastin, A. J., Matsuo, H., Baba, Y., Redding, T. W., Nair, R.M.G., Debeljuk, L.: Science, *173*, 1036, 1971 c

Schally, A. V., Arimura, A., Baba, Y., Nair, R.M.G., Matsuo, H. Redding, T. W., Debeljuk, L.,

White, W. F.: Biochem. and Biophys. Res. Communs, *43*, 393, 1971 d
Schally, A. V., Arimura, S., Kastin, A. J.: Science, *179*, 341 1973
Schapira, G., Dreyfus, J. C.: *Pathologie moléculaire*, Paris, Masson et Cie, 1975
Schechter, N., Momose, K., Rudney, N.: Biochem. Biophys. Res. Comunn., *48*, 833, 1972
Schemyakin, M. M., Aldanova, N. A., Vinogradova, E. I., Feighina, M. Yu.: Tetrahedron Letters, *28*, 1921, 1963
Scheuerbrandt, G., Goldfine, H., Baronovsky, P. E., Bloch, K.: J. Biol. Chem. *236*, PC 70, 1961
Schildkraut, C. L., Marmur, J., Fresco, J. R., Doty, P.: J. Biol. Chem., *236*, PC 2, 1961
Schmidt, G., Hacht, L., Failot, P., Greenbaum, L., Thannhausen, S. J.: J. Biol. Chem., *197*, 601, 1952
Scholnick, P. L., Hammaker, E., Marer, H. S.: J. Biol. Chem., *247*, 4132, 1972
Schramm, M.: J. Biol. Chem., *233*, 1169, 1958
Schucher, R., Hokin, L. E.: J. Biol. Chem., *210*, 551, 1954
Schwachkin, Ya. P., Schmeleva, G. A., Krivțov, V. F., Fedotov, V. P., Ivanova, A. I.: Biokhimia, *37*(5), 966, 1972
Schwartz, V., Golberg, L., Kombrower, G. M., Holzel, A.: Biochem. J., *62*, 34, 1956
Schwartz, R. T., Schmidt, M. F. G., Datema, R.: Biochem. Soc. Trans., 7, 322, 1979
Sdrobici, D., Dumitrescu, C.: Viața medicală, *12*, 1409, 1965
Sebrell, Jr., Harris, G. (edit.), *The Vitamins*. vols. 1, 2, New York Academic Press, 1954
Segal, S., Blair, A., Topper, Y. J.: Science, *136*, 150, 1962
Segre, G. V., Potts, J. T., Jr.: *Calcium Metabolism, Bone and Metabolic Bone Diseases*. F. Kuhlencordt, H.—P. Kruse, edit. Berlin, Heildelberg, New York, Springer Verlag, 1975 pag. 285—294
Sela, M.: *New Perspectives in Biology*. Amsterdam, London, New York, Elsevier Publishing Company, 1964
Severin, C. E.: Vestnik Akad. Nauk SSSR, *1*, 93, 1976
Sézille, G.: *Problémes actueles de Biochimie générale* edit. par P. Boulanger, J. Polonovski. Paris, Masson & Cie, 1972, pag. 23—54
Shapiro, H. S., Chargaff, E.: Biochim. Biophys. Acta, *91*, 262, 1964
Shaw, J. E., Ramwell, P.W.: *Methods of Biochemical Analysis* edit. by Glick, New York, Interscience, *17*, 325—371, 1969
Shemin, D., Rittenberg, D.: J. Biol. Chem., *167*, 875, 1947
Shepherd, R. G., Howard, K. S., Bell, P. H., Cacciola, A. R., Child, R. G., Davies, M. C., English, J. P., Finn, B. M., Meisenhelder, J. H., Moyer, A. W., Scheer, van der, J.: J. Amer. Chem. Soc., *78*, 5051, 1956 a
Shepherd, R. G., Willson, S. D., Howard, K. S., Bell, P. H., Davies, D. S., Davis, S. B., Eigner, E. A., Shakespeare, N. E.: J. Amer. Chem. Soc., *78*, 5067, 1956 b
Shoden, A., Gabrio, B. W. Finch, C. A.: J. Biol. Chem., *204*, 823, 1953
Simpson, R. T., Vallee, B. L.: Federation Proc., *27*, 291, 1968
Sinsheimer, R. L.: J. Mol. Biol., *1*, 43, 1959
Sinsheimer, R. L.: J. Mol. Biol., *1*, 37, 1959
Sinsheimer, R. L.: Sci. Amer., *207*, 109, 1962
Sirlin, J. L., Loening, U. E.: Biochem. J., *109*, 375, 1968
Smithies, O., Connell, G. E., Dixon, G. H.: Nature, *196*, 232, 1962
Sonne, J. C., Buchanan, J. M., Delluva, A. M.: J. Biol. Chem., *173*, 69, 1948

Sörensen, S.P.L.: Biochem. Z., *21*, 131, 1909

Soru, E., *Biochimie medicală*, Ediția a II-a, vol. I, București, Editura didactică și pedagogică, 1959

Sparrow, A. H., Nauman, A. F.: Science, *192*, 524, 1976

Spelsberg, Ph., Steggles, A., O'Malley, B. W.: J. Biol. Chem., *246*, 4188, 1971

Spelbsberg, Ph., Steggles, A., Chytil, F., O'Malley B. W.: J. Biol. chem., *247*, 1368, 1972

Spencer, J. H., Chargaff, E.: Biochim. Biophys. Acta , *68*, 9, 18, 1963

Speyer, J. F., Lengyel, P., Basilio, C., Ochoa, S.: Proc. Natl. Acad. Sci., USA, *48*, 63, 1962

Speyer, J. F., Lengyel, P., Basilio, C., Ochoa, S.: Proc. Natl. Acad. Sci., USA, *48*, 441, 1962

Spiegelman, S., în *The Chemical Basis of Heredity*, Edited by W. H. McElroy și B. Glass, Baltimore, Johns Hopkins Press, 1957, p. 239

Spiegelman, S.: Sci. Amer. *210*, 48, 1964

Spiegelman, S., Hayashi, M.: Cold Spring Harbor Simp. Quant Biol., *28*, 161, 1963

Spik, G., Monsigny, M., Montreuil, J.: C. R. Acad. Sci. (Paris), *261*, 1137, 1965

Spik, G., Monsigny, M., Montreuil, J.: C. R. Acad. Sci. (Paris), *263*, 893, 1966

Spik, G., Monsigny, M., Montreuil, J.: Bull. Soc. Chim. Biol., *50*, 2186, 1968

Spik, G., Montreuil, J.: Bull. Soc. Chim. Biol., *51*, 1271, 1969

Spirin, A. S.: Eur. J. Biochem., *10*, 20, 1969

Spirin, A. S., Gavrilova, L. P.: *The ribosome*, Springer Verlag, 1969

Srivastava, S., Meredith, W. O. S.: Canad. J. Bot., *40*, 1257 1962

Stadtman, E. R.: Advances in Enzymol., *28*, 41, 1966

Staehelin, T., Wettstein, F. O., Oura, H., Noll, H.: Nature, *201*, 264, 1964

Stein, W. H.: J. Biol. Chem., *201*, 45, 1953

Stein, W. H., Moore, S.: J. Biol. Chem., *211*, 915, 1954

Stein, G., Spelsberg, T., Kleinsmith, L.: Science, *183*, 817, 1974

Steiner, D. F.: Trans. N. Y. Acad. Sci., seria II, *30*, 60, 1967

Steiner, D. F., Cunningham, D. Spiegelman, L., Bradley, A.: Science *157*, 697, 1967

Stent, G. S.: Science, *144*, A., 1210, 1974

Stern, H., Nanney, D. L.: *The Biology of Cells*. New York, London, Sydney, John Wiley Sons Inc., 1965

Stern, A., Gibbons, W., Craig, L. C.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *61*, 734, 1968

Stevens, A.: Biochem. Biophys. Res. Comm., *3*, 92, 1960

Stewart, J. M., în *Structure-Activity Relationships of Protein and Polypeptide-Hormones*, Université de Liège, 1971 pag. 23—30

Stoltzfus, C. M., Shatkin, A. J., Banerjee, A. K.: J. Biol. Chem., *248*, (23) 7993, 1973

Strominger, J. L., Higashi, Y., Sandermann, H., Stone, K. J., Willoughby, E.: în *The Biochemistry of the Glycosidic Linkage*, R. Piras și H. G. Pontis, editori, New York, Academic Press, 1972 p. 135

Stumpf, P. K., Barber, G. A.: J. Biol. Chem., *227*, 407, 1957

Stumpf, W. E.: Endocrinology, *83*, 777, 1968

Sueoka, N.: *The Bacteria*, Edited by Gunsalus, I. C., și Stanier, R. Y., 1964, pag. 416

Sutherland, E. W., Butcher, R. W., Robinson, G. A., Hardman, J.G.: în *Wirkungsmechanismen der Hormone*, Berlin, Heidelberg, New York, Springer Verlag, 1967, pag. 1—32

Sutherland, E. W.: Science, *177*, 401 1972

Sutherland, E. W., Rall, T. W.: Pharmacol. Rev., *12*, 265, 1960

Sutton, H. E., Jamieson, G. A.: în *Glycoproteins. Their Composition, structure and function*, ed. a 2-a, Gottschalk, A editor, Amsterdam, London, New York, Elsevier Publ. Co, 1972, pag. 653

Svennerholm, E., Svennerholm, L.: Nature, (London), *198*, 688, 1963

Swaneck, G. E., Chu, L. L. H., Edelman, I. S.: J. Biol. Chem., *245*, 5382, 1970

Swanson, R. F., David, I. B.: Proc. Natl. Acad. Sci., USA, *66*, 117, 1970

Sweely, C. C., Klionsky, B : J. Biol. Chem., *238*, 3148, 1963

Switf, H.: Proc. Nat. Acad. Sci., USA, *36*, 643, 1950

Synerholm, M.E., Zimmerman, P. W: Contrib. Boyce Thompson. Inst., *14*, 369, 1947

Szabo, G., Endröczi, E.: Endokrinologie, *63*, 396, 1974

Szent-György, A.: *Bioenergetica*, București, Editura științifică, 1962

Tait, G. H., Vallee, B. L.: Proc. Nat. Acad. Sci., USA, *56*, 1247, 1966

Takeda, R., Nakabayashi, H., Kawato, M., Ueda, M., Matsubara, F.: Endokrinologie, *65*, 171, 1975

Tarr, G. E., Fitch. W. M.: Biochem. J., *159*, 193, 1976

Tatarskaya, R. I., Abrosimova-Amelyanchik, N. M., Axelrod, V. D., Mirzabekov, A. D., Krutilina, A. I. Li, L., Venkstern, T. V., Bayev, A. A.: *Structure and Function of Transfer RNA and 5S RNA*, Fröholm L. O., and Laland. S. G., edts., New York, London, Universitetsforlaget, Oslo, Academic Press, 1968, pag. 65—73

Taylor, J. H.: Science, *118*, 555, 1963

Terroine, Th.: *Les interrelation vitaminiques*, Paris, Edition du C.N.R.S., 1966

Thompson, J. F., Morris, C. J., Smith, I. K.: Ann. Rev. Biochem., *38*, 137, 1969

Thannhauser, S. J., Benotti, J. Walcott, A. I., Reinstein, H.: J. Biol. Chem., *120*, 717, 1939

Thannhauser, S. J., Boncoddo, N. F.: J. Biol. Chem., *172*, 135, 141, 1948

Thannhauser, S. J., Setz, P., Benotti, J.: J. Biol. Chem., *126*, 785, 1938

Thannhauser, S. J.: *Lipidoses*, 3rd ed., New York & London, Grune & Stratton, 1958

Thompson, R. Y., Paul, J., Davidson, J. N.: Biochem. J., *69*, 553, 1958

Thudichum, J. L. W.: *A Treatise of the Chemical Constitution of the Brain*. London, 1884

Thudichum, J. L. W.: *Die chemische Konstitution des Gehirns des Menschen und der Tiere*. Tübingen, 1901

Therriault, D., Nichols, T., Jensen, G.: J. Biol. Chem., *233*, 1061, 1958

Tilander, B., Strandberg, B., Fridborg, K.: J. Mol. Biol., *12*, 740, 1965

Tiselius, A., Hjerten, S., Levin, O.: Arch. Biochem. Biophys., *65*, 132, 1956

Titova, G. V.: Biokhimia, *39*, 418, 1974 a

Titova, G. V.: Biokhimia, *35*, 1028, 1974 b

Toft, D., Gorski, J.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA, *55*, 1574, 1966

Tomlinson, R. V., Ballou, C. E.: J. Biol. Chem., *236*, 1902, 1961

Travers, A.: *Biochemistry of Nucleic Acids* Edited by K. Burton, London, Baltimore, Butterworths, 1974

Tregear, G. V., van Rietschoten, J., Greene, E., Keutmann, H. T., Niall, H. D., Reit, B., Parsons, J. A., Potts, J. T. Jr.: Endocrinology, *93*, 1349, 1973

Troy, F. A., Frerman, F. E., Heath, E. C.: J. Biol. Chem., *246*, 118, 1971

Trucco, R. E., Caputto, R.: J. Biol. Chem., *206*, 901, 1954

Trufanov, A. V.: *Biokhimia i fiziologia vitaminov i antivitaminov*, Moskva, Selhozghiz, 1959

Tsuda, K., Hayatsu, R., Kishida, Y., Akagi, S.: J. Amer. Chem. Soc. *80*, 921, 1958

Valentine, F. R., Bergmann, W.: J. Org. Chem., *6*, 452, 1941

Vallee, B. L., Stein, E. A., Sumerwell, W. N., Fischer, E. H.: J. Biol. Chem., *234*, 2901, 1959

Vallee, B. L., Coombs, T. L., Hoch, F. L.: J. Biol. Chem., *235*, 45 PC, 1960

Vallee, B. L., Wacker, W. E. C.: *The Proteins.* Edit. by Neurath, H., vol. 5, Academic Press, New York, 1970, pag. 49

Vanaman, T. C., Wakil, S. J., Hill, R. L.: J. Biol. Chem., *243*, 6420, 1968

Vane, J. R.: *Angiotensin,* edited by Page, J. H., and Bumpus, F. M., Berlin-Heidelberg, New York, Springer Verlag, 1974, pag. 17—40

Vane, J. R.: Nature, *230*, 382, 1971

Veen, H.: Acta Botanica Neerlandica, *12*, 129, 1963

Vicks, W. D., Kenney, F. T.: Science, *144*, 1346, 1964

du Vigneaud, V., Ressler, C., Swan, J. M., Roberts, C. W., Kotsoyannis, P. G.: J. Am. Chem. Soc., *76*, 3115, 1954

du Vigneaud, V., Bartlett, M. F., Johl, A.: J. Am. Chem. Soc., *79*, 5572, 1957

du Vigneaud, V., Gish, D. I., Kotssoyannis, P. G., Hess, G. P.: J. Am. Chem. Soc., *80*, 3355, 1958

Wagner, R. K., Hughes, A.: *Androgens II and Antiandrogens.* Berlin, Heidelberg, New York, Springer Verlag, 1974 pp. 2—28

Wakil, S. J., Ganguly, J.: J. Am. Chem. Soc., *81*, 2598, 1959

Wald, G.: Vitam. and Horm., *18*, 417, 1960

Walker, P. M. B.: Progr. in Biophys. and Mol. Biol., *23*, 147, 1971

Warburg, O., Christian, W.: Biochem. Z., *287*, 440, 1936

Warburg, O., Christian, W.: Biochem. Z., *292*, 287, 1937

Watanabe, T., Morimoto, A., Shiomi, T.: Can. J. Microbiol., *21*, 1889, 1975

Watson, J. D.: *Molecular biology of the gene.* New York, Amsterdam, Benjamin Inc., 1965

Watson, J. D., Crick, F. H. C.: Nature, *171*, 737, 1953

Watson, J. D., Crick, F. H. C.: Nature, *171*, 964, 1953

Weinstein, B.: Experientia, *24*, 406, 1968

Weisblum, B., Benzer, S., Holley, R. N.: Proc. Natl. Acad. Sci., USA, *48*, 1449, 1962

Weiss, S. B.,: Proc. Natl. Acad. Sci., *46*, 1020, 1960

Westall, R. G.: Biochem. J., *60*, 247, 1955

Westall, R. G.: Biochem. J., *77*, 135, 1960

Westley, J., Wren, J. J., Michell, H. K.: J. Biol. Chem., *229*, 131, 1957

Wight, T. N., Ross, R.: J. Cell Biol., *67*, 675, 1975

Wilkins, M. H. F., Stokes, A. R., Wilson, H. R.: Nature, *171*, 738, 1953

Wilkins, M. H. F., Stokes, A. R., Wilson, H. R.: Nature, *172*, 759, 1953

Wilkins, M. H. F.: Science, *140*, 941, 1963

Wilkins, M. H. F.: Cold Spring Harbor Simp. Quant. Biol., *21*, 75, 1956

Windaus, A., Schenk, F., Werder, F.: Z. Physiol. Chem., *241*, 100, 1936 a

Windaus, A., Stange, O.: Z. Physiol. Chem., *244*, 218, 1936 b

Windaus, A., Trantman, G.: Z. Physiol. Chem., *247*, 185, 1937 b

Windaus, A., Bock, F.: Z. Physiol. Chem., *245*, 168, 1937 a

Wohl, G., Goodhart, I., Edit: *Modern Nutrition in Health and Diseases*, 3 rd Edition, Philadelphia, Lea Febiger, 1964

Wood, W. B., Berg, P.: Proc. Natl. Acad. Sci., USA, *48*, 94, 1962

Wooley, D. W.: *A study of antimetabolits*, New York, London, 1952

Wootton, J.A.M., Wright, L. D.: Comp. Biochem. Physiol., *5*, 253, 1962

Wright, A., Dankert, M., Robbins, P. W.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *54*, 235, 1965

Yamamoto, K. R., Alberts, B. M.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *69*, 2105, 1972

Yamamoto, K. R., Alberts, B. M.: J. Biol. Chem., *249*, 7076, 1974

Yamamoto, K. R.: J. Biol. Chem., *249*, 7068, 1974

Yang, W. K., Novelli, G. D., *Methods in Enzymology*. Edit. by S. P. Colowick and N. O. Kaplan, 20, part C, New York, Academic Press, 1971, pag. 44

Yaniv, M., Folk, W. R.: J. Biol. Chem., *250*, 3243, 1975

Yankofsky, S. A., Spiegelman, S.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *48*, 1466, 1962

Yankofsky, S. A., Spiegelman, S.: Proc. Natl. Acad. Sci., *48*, 1466, 1962

Yankofsky, S. A., Spiegelman, S.: Proc. Natl. Acad. Sci., *49*, 538, 1963

Yankofsky, S. A., Spiegelman, S.: Proc. Natl. Acad. Sci., *48*, 1069, 1963

Yanofsky, C., Drapeau, G. R., Guest, J. R., Carlton, B. C.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *57*, 296, 1967

Yomo, H., Iinuma, H.: Agr. Biol. Chem., *27*, 76, 1963

Young, L., Maw, G. A., *The metabolism of sulphur compounds*. London, New York, 1958

Yudaev, N. A., Schwachkin, P., Pozniak, M. G., Fedotov, V. P., Vdovina, R. G., Volujskaja, E. H., Ryabtsev, M. N. şi alţii: Biokhimia, *38* (1), 221, 1973

Yudaev, N. A., Afinogenova, S. A., Pokrovskii, B. V., Protasova, T. N.: Uspekhii sovrem. biologhii, *80*, 351, 1975

Zabin, I.: Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol., *28*, 431, 1963

Zachau, H. G., *Structure and Function of Transfer RNA and 5S RNA*, Fröholm L. O., and Laland, S. G., edts. New York, London, and Universitetsforlaget, Academic Press, Oslo, 1968, pag. 169—174

Zaiţeva, G. N.: *Biokhimia azotobactera*. Moscova, Izd. Nauka, 1965

Zechmeister, L.: *Cis-trans Isomeric Caroteroids. Vitamins A and Arylpolyenes*, Wien, Springer, 1962

Zerov, Yu. P.: Uspekhii sovrem. biol., *81* (1), 21, 1976

Zimmerman, A. E., Yip, C. C.: J. Biol. Chem., *249*, 4021, 1974

Zöllner, N., Wolfram, G.: *Biochemical Disorders in Human Disease*, edit. by R.H.S. Thompson şi I.D.P. Wootton, 3rd edition, London, J. & A. Churchill, 1970

* * * *The Antigens*. Edit. by M. Sela, vol. I. New York, London, Academic Press, 1973

* * * *A Laboratory manual of Analytical Methods of Protein Chemistry (including Polypeptides)*. Edited by Alexander, P., Block, R. J., vols. 1—3, London, Oxford, New York, Paris, Pergamon Press, 1960—1961

* * * *Biosintez belka i nucleinovih kislot*. Pod redakţii A. S. Spirin, Moscova, Izd. „Nauka", 1965, pag. 7—49, 126—170, 171—194, 1965

* * * *The Biochemistry of Virus Replication*. Simposium of FEBS. Edit. by Laland S. G. and Fröholm L. O., Oslo, London, New York, Universitetsforlaget, Academic Press, 1968

* * * *The Carbohydrates. Chemistry and Biochemistry*. Second Edition. Edit. by Pigman W., Horton D., vol. I A, II A, II B, New York, London, Academic Press, 1970

* * * *8th International Congress of biochemistry*, Abstracts Volum Switzerland, 1970

* * * *Proceedings of the Plenary Session seventh International Congress of Biochemistry*, Tokyo, 1967

* * * *Protides of the Biological Fluids. Proceeding of the twelfth colloquium Bruges*, Edited by H. Peeters, Amsterdam, New York, London, Elsevier Publishing Company, 1965

* * * *Sovremennie metodi v biohimii.* Pod redakţii Orehovici V. N., Moscova, Izd. Mediţiina, 1968

* * * *Structure and Function of Transfer RNA and 5S-RNA.* Edited by L. O. Fröholm and S. G. Laland, Oslo, London, New York, Universitetsforlaget, Academic Press, 1968

* * * *Structura i funcţia kletocinovo iadra.* Izd. Nauka, Moscova, 1967

* * * *Synthesis and structure of macromolecules.* Cold Spring Harbor Symposia on quantitative biology. vol. XXVIII, New York, 1963

* * * *Uglevodi i uglevodnii obmen v jivotnom i ratstitelnom organizmah.* Izd. Acad. Nauk. SSSR, Moscova, 1959

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITARĂ

INDICE ALFABETIC

(Cifrele tipărite cu litere groase indică pagina unde substanța respectivă este studiată amănunțit. Semnul * indică menționarea unei substanțe într-un tabel; litera u. = vezi și paginile următoare. Cifrele scrise cursiv indică pagina la care începe descrierea metabolismului substanței respective).

A

Acetaldehidă activă 602 și u., 604 și u., **607***, 815
Acetalfosfolipide 448 și u.
Acetat activ v. Acetil ~ SCoA
Acetilacetat **708*** și u., 710
Acetilcitidina **205***
Acetilcolină 250
Acetilcolinesterază 250
Acetil ~ SCoA 329, 627 și u., **708** și u., 717 și u., 735, 791 și u., 817 și u.
— biosinteză 354, 627 și u., 708 și u.
— rol în biosinteza acizilor grași 681 și u.
în ciclul K r e b s 627 și u., 643 și u.
în oxidarea acizilor grași 695 și u., **700*** și u.
în biosinteza steroizilor 717 și u.
ΔG în hidroliză 627
— structură 354
N-Acetilglutamat 822 și u.
Acetoacetat **607***, **708*** și u. 735 și u.
Acetoacetil ~ SCoA **354**, 356, 717 și u., 735, 791 și u.,
Acetoacetil-ACP 685 și u., 689 și u., 693 și u.
Acetil ~ SCoA carboxilaza 329, 330, 682 și u.
Acetil ~ SCoA sintetaza 238, 247, 697 și u.
Acetilfosfat **355, 648***
Acetilgalactozamina 289, **290***
Acetilglucozamina 289, **290***
Acetobacter suboxidans 357, 381
Acetoina 605
Acetonurie *709*, *761*
Acetonemie *709*, *761*
Acid
— acetic 427*, *707* și *u.*, *734*
— acetic activat v. Acetil ~ SCoA
— acetilacetic *708* și u., *806**, *807**, *815*, *818*
— N-acetilneuraminic 290 și u., 295 și u., 299 și u., 458 și u., **459***
— N-acetilglutamic *822* și *u.*
— adenilic (i) 193
— adenozin-5′-difosforic (ADP) 349, **351**, *831* și *u.*, *835* și *u.*
— adenozin-5′-fosfosulfuric **192***
— adenozin-5′-monofosforic (AMP) **191**, 349, 350, *831* și *u.*, *835* și *u.*
— adenozin-3′-monofosforic **191**
— adenozin-3′,5′-monofosforic ciclic (cAMP) **191**, 534* și u., *714* și *u.*
— adenozin-5′-trifosforic (ATP) 349, *831*
— alantoic *856*
— aldobiouronic 413
— alginic 413
— aminoacetic v. glicocol
— aminoadipic **36***, *791*
— *p*-aminobenzoic 339
— α-aminobutiric 29
— γ-aminobutiric **25***, 334, *769*
— β-aminoizobutiric **35***, *816*, *857*
— δ-aminoizovalerianic *792*

BCU CLUJ-NAPOCA UNIVERSITY LIBRARY

— γ-aminolevulinic *889**
— amino-β-cetoizobutiric
— α-amino-ε-cetopimelic *787*
— amino-β-hidroxibutiric **35***
— antranilic 352
— arahic 427*
— arachidonic 427*, *690* și *u.*, *710* și *u.*
— argininosuccinic 32, *823* și *u.*
— ascorbic **319** și u. *617* și u.
— aspartic 23*, 26*, *645* și u.
— biosinteză *645* și *u.*, *780* și *u.*, **781***
— catabolism *645* și *u.*, *780* și *u.* **781***
— metabolism *645* și *u.*, *822* și u.
— participare la procese metabolice *781**, *822* și u.
— răspîndire în proteine 23*, 31.
— participare în transaminări 335
— barbituric 185
— benzochinoacetic *811*
— blastidic **189**
— behenic 427*, *457*
— butiric **427***, *431*
— biliari **482***, 721 și u., 722*
— biosinteză **722** și u.
— catabolism *723* și u.
— formule structurale 482, 483
— rol în metabolism 482, *720*
— caprilic 427*
— caproic 427*
— capronic 427*
— N-carbamilaspartic 283, *834*
— celobiuronic 389
— cerebronic 456, 460
— cerotic 427*
— cetoadipic *789* și u., *791*
— α-cetobutiric 335, *817*
— ceto-9-decen-2-*trans*-oic
— 2-cetodeoxigluconic
— cetoformatori 773
— α-cetoglutaric 625 și u., *788* și u.
— formare din aminoacizi *788*, *789*, *807*
— 3-cetogulonic *617* și u
— α-cetoizovalerianic *815* și u., *818* și u.
— α-cetoizocapronic *818*
— α-cetosuccinic
— chaulmoogric 428*, 429
— chenodeoxicolic **482**, *722**
— chinolinic *813* și *u.*
— *cis*-aconitic 625 și u.
— cisteic 780
— cisteinsulfinic *780*
— citidin-5′-difosforic (CDP) 353 și u. *834* și *u.*
— citidin-5′-monofosforic (CMP) *834* și *u.*
— citidin-5′-trifosforic (CTP) 285 și u. 353, *834* și *u.*
— citidilic (CMP) v. citidin-5′-monofosforic
— citidin monofosfo-N-acetilneuraminic 192
— citric *606* și u., *625* și u.
— biosinteză *629* și u.
— structură *629*
— rol în fermentații 606 și u.
— clupanodonic 427*
— colic **482***, 722*, *724*, *733*
— condroitin sulfuric 414 și u.
— *p*-cumaric *809*
— 1,3-difosfogliceric 554, 592
— 2,3-difosfogliceric 593
— dehidroascorbic 319, 320
— 5-dehidroshichimic *798* și *u.*
— 5-dehidrochimic *798* și *u.*
— dihidrofolic **343** și u.
— dehidroretinoic 514
— deoxicolic **482***, **722***
— deoxicitidilic *831*
— deoxiribonucleic (i), DNA 179, 218*
— absorbție în UV 229 și u.
— compoziție în baze azotate **218** și u., 221 și u.,
— biosinteză *837* și u.
— circular 226, 228
— constante de sedimentare 219 și u.
— DNA-amorsă *846* și *u.*
— DNA-ligaza *842* și *u.*
— DNA-polimeraza *840* și *u.*
— dimer catenat 228
— denaturare **229** și u., 850 și u.
— hibrizi 232
— legături de hidrogen 224, 225, 226
— masă moleculară 219 și u., **220***, 229
— modelul Watson-Crick-Wilkins 223
— monocatenar 226, 228
— punct de fuziune 231 și u.
— renaturare 231, *850* și *u.*
— repetitiv sau satelit 221
— replicare *837* și *u.*, *839** și u., *843* și *u.*, *845**
— raporturi între baze 221 și u.
— regula lui Chargaff 223

— rol în biosinteza proteinelor *866* și *u.*, *868** și *u.*
— secvența bazelor 219
— structura dublu-helicoidală **223**, 227, 229, *837*
— structura primară (model) **219**, 220
— structura secundară (model) **224** și u., *841*
— transcripție 232, *849* și *u.*, *866* și *u.*,
— viscozitate 229
— 1,3-difosfogliceric 554 și u., *603*
— 2,3-dihidropicolinic *786* și u.
— dihidrofolic 343 și u.
— dihidroorotic *834*
— elaidic 432
— eleostearic **427***, *432*
— fenilacetic 804*, 806*
— fenillactic 804* și u., *806**
— fenilpiruvic *800*, **804***, *806**
— fitanic 430*, *706*
— floretic **809***
— folic 338, 343
— derivați **340*** și u.,
— funcții 343 și u.
— structură 339, 340* și u.
— folinic 339, **341***
— formilglutamic *821*
— formiltetrahidrofolic 345, *872*
— formiminotetrahidrofolic 344
— N-formiminoglutamic 344
— 3-fosfat-5′-fosfosulfuric 192
— fosfatidic (i) 446, *749* și *u.*
— fosfoenolpiruvic 556, 593 și u., *800*
— 2-fosfogliceric 593
— 3-fosfogliceric 552, *554*, *592*, *775*
— 6-fosfogluconic *608* și u., *615*
— 5-pirofosfomevalonic *717** și u., *719*
— 5′-fosfoshichimic *801** și u.
— fumaric 625 și u., **804***, *806**, 807
— 4-fumarilacetoacetic *806**
— gadoleic 427*
— galacturonic 411, *574*
— gibberellic *734** și *u.*
— glicocolic 724
— glicoformatori *773*
— glioxilic 630 și u., *643* și u., *785*, *856*
— gluconic *608* și u.
— glucuronic 411, *615* și u., *727*
— glutamic 21, 23*, 26*, 31, 334 și u., *645* și u., *769*, *775*, *782*, *807*, *821*
— biosinteză *645* și u., *681* și u., *688** și *u.*, *693** și *u.*, *782* și *u.*
— catabolism *645* și u., *695* și u., *700* și u., *706* și *u.*, *769*, *782* și *u.*
— metabolism 370, *645* și u., *681* și u. *783**
— răspîndire 31
— structură 23*, 26*, 370
— gorgonic 34
— grași 426 și u., 433 și u., *681* și *u.*, *690* și *u.*,
— *710* și *u.*, *763* și *u.*
— acetilare *682* și u., *684* și u.
— biosinteză *686* și u., *688**, *689* și u.
— catabolism *696* și *u.*, *700** și *u.*, *706* și u.,, *710* și *u.*
— clasificare 427* și u., 430*
— dehidrogenare *690* și u., *693*
— hidroxiacizi 428, 430
— hidrogenare *691* și u.
— izomerie 431 și u.
— liniari **427*** și u.
— nesaturați 427*, 430*, 459, *690* și *u.*, *693*
— oxidare 437, *695* și *u.*, *700* și *u.*, *706* și *u.*, *710* și *u.*
— β *695* și u., **700*** și *u.*
— ω *707* și *u.*
— α *706* și *u.*
— cu cicluri în catenă 428
— polinesaturați 427*
— polimorfism 433
— proprietăți 431 și u., 433 și u.
— saturați 427*
— structură 427*, 428*, 430*
— guanilic (GMP) v. guanozin-5′-fosforic
— guanozin-5′-difosforic (GDP) *831* și *u.*, *835* și *u.*
— guanozin-5′-monofosforic (GMP) *831* și *u.* *835* și *u.*
— guanozin-3′,5′-monofosforic ciclic (cGMP) 192, 351, 536
— guanozin-5′-trifosforic (GTP) *831* și *u.*, *835* și *u.*
— gulonic 616 și u.
— hexacosenoic 427
— hialobiouronic **389**
— hialuronic 389, **414**
— hidantoic 55
— 5-hidrochinic *799* și u.
— 3-hidroxiantranilic *813*

— *p*-hidroxibenzoic *806*, 809**
— hidroxibutiric 432
— hidroxifenillactic *806*, 809**
— hidroxifenilpiruvic *800, 804*, 806* 807*
— hidroxiglutamic *785*
— *p*-hidroximandelic* *809*
— hidroxistearic 430*
— hipuric 696
— homocitric *788*
— homogentizinic 34, *806*, 807* şi *u., 811*
— imidazolacetic *821*
— imidazollactic *821*
— imidazolpiruvic 821
— indolilacetic *814*
— indolilpiruvic *814*
— inozinic 187
— inozin-5′-difosforic (IDP) *831* şi *u.*
— inozin-5′-monofosforic (IMP) *831* şi *u.*
— inozin-5′-trifosforic (ITP) *831* şi *u.*
— iodacetic 250
— iodgorgonic v. Diiiodtirozina
— izobutiric 430*, 431
— izocaproic *726**
— izocitric *625* şi *u.*
— izomiristic 430*
— izovalerianic 430* *464*
— lacceroic 427*
— lactic 239, *324* şi u.
— lactobacilic 428*
— lauric 427*, 428 şi u.
— laurinoleic 427*
— levulinic 889
— licanic 428*
— lignoceric 427*, 456
— linolenic 432, *690* şi *u., 710* şi *u.*
— linolic 417*, 436, *690, 692*
  — biosinteză *690, 692*
  — izomerie 432, 433
— lipoic 316 şi u.
— litocolic 482*, *722**
— maleic 238
— maleilacetoacetic *804** şi *u., 806*, 807*
— malic *625* şi u., *643* şi u., *785*
— melisic 427*
— malonic 330
— β-metilaspartic 370
— metilbutiric 464
— metilentetrahidrofolic 343, 344 şi u.
— metilmalonic 331, 371
— mevalonic *717* şi *u.*, *733* şi *u.*, *742* şi *u.*
— micolipenic 430*
— micoceranic 430*
— miristic 427*, 428 şi u.
— miristinoleic 427*
— monofloracetic *629*
— monoflorcitric *629*
— neuraminic 289, 290*, 458
— nervonic 427*, 456, *690*
— nicotinic *813*
— nicotinamida (niacina) *813*
— nizinic 428*
— obtuzilic 427
— orniturie 33
— orotic *834*
— oxalilacetic 331, *625* şi u.
  — biosinteză *625* şi u.
    din aminoacizi 335
    în ciclul Krebs 625 şi u.
    din acidul piruvic 556
— oxinervonic 456
— oleic 427*, 431, *690* şi u.
  — biosinteză *690, 692*
  — degradare *690* şi u.
  — izomerie 432
— orotic 180, 184*
— orotidilic 187
— palmitic 427*, 428 şi u., 514
  — biosinteză *686* şi u.,
  — degradare *689, 690, 692*
  — structură 427*
— palmitoleic 427*, *690, 692*
— pantetein-4-fosforic v. 4′-fosfopantoteina
— pantotenic 354, *684* şi *u.*
  — răspîndire 354 şi u.
  — rol în metabolism 356, *684* şi u.
— pectic 408
— pectinic 408 şi u.
— petroselic 427*, 431
— pipecolic *790*
— Δ^1-piperidein carboxilic *787, 790*
— pirolidin carbonic 26*
— piruvic 323, 331, 355, *625* şi *u., 785, 786, 815*
— poliuridilic *854* şi *u.*
— prefenic *800* şi *u.*
— presinoic 70
— propionic 331, *705* şi *u., 774*

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

— metabolism *704* şi u.
în biosinteza succinil ~ SCoA *705* şi u.
în metabolismul aminoacizilor *774*, *816*, *817**
— prostanoic **441**
— pteroilglutamic 340 şi u.
— pteroic 339
— ribonucleic (i) 179, 193, **199***, 200 şi u., *853* şi u.
— RNA-polimeraza-DNA dependentă *847* şi u.
— RNA-polimeraza RNA dependentă *852* şi u.
— mRNA — ribonucleic mesager 199, **202** şi u., *865* şi u.
— biosinteză *846* şi u., *850* şi u.
— caracterizare 202, *866* şi u.
— compoziţie în baze 202 şi u.
— complementaritate de baze cu DNA *847* şi u., *849* şi u., *866*
— perioade de înjumătăţire 203
— proprietăţi 203, *847*, *850*, *866* şi u.
— rol în biosinteza proteinelor *865* şi u., *872* şi u.
— structură primară *870**
— translaţie *869*
— tRNA — ribonucleici de transport 204 şi u., 350
— biosinteză *851* şi u.
— componente minore 204, **205***
— compoziţie în baze azotate 204 şi u.
— localizare în celulă 211 şi u.
— masă moleculară 204
— metilare 204 şi u., 206 şi u.
— rol în biosinteza proteinelor *862*, *863** şi u.
— specii moleculare 205 şi u., 211, *863* şi u.
— structură primară, secundară şi terţiară 206 şi u., 209
— rol în biosinteza proteinelor 211, *863* şi u., *872* şi u.
rRNA — ribonucleic ribosomal 193, **212** şi u.
— biosinteză *851* şi u.
— compoziţie în baze azotate 212 şi u., 216
— proprietăţi 213 şi u., 216
— rol în biosinteza proteinelor *869*, *873** şi u., *875** şi u.
— specii moleculare 212 şi u.
— structură 214
— ribonucleici, alte tipuri 199, 201
— riboziluric **187**
— ricinoleic 428*, 430*
— ribozo-5-fosforic 553, 555, *609* şi u.
— ribozo-5′-difosforic 552, *557**
— ribulozo-1,5-difosforic 553, *609* şi u.
— sialic, v. neuraminic
— sedoheptulozo-7-fosforic 553* şi u., *611*, *612**
— shichimic *798* şi u.
— sorbic 427*
— stearic 427*
— sterculic 428*
— succinic *625* şi u.
— biosinteză 371, *629*
— metabolis *629* şi u.
— oxidare la acid fumaric *644* şi u.
— β-sulfinil-α-aminopropionic 37*
— taricic 428
— taurocolic *724*
— tetrahidrofolic 343 şi u., *872*
— tiaminpirofosforic 322 şi u.
— structură 322 şi u.
— în decarboxilarea α-cetoacizilor 323 şi u.
— în oxidarea piruvatului 325
— tiazolidincarbonic 25
— timidilic *835* şi u.
— biosinteză *835* şi u.
— tioctic, v. acid lipoic
— trihidroxicolanic *722** şi u.
— tocinoic 70
— tuberculostearic **428***, 430
— uridin-5′-difosforic (UDP) *833* şi u.
— uridindifosfat glucuronic **196***
— uridindifosfat N-acetil-galactozamina **197***
— uridindifosfat N-acetil galactozamino-sulfuric **197***
— uridin-5′-monofosforic (UMP) *833* şi u.
— uridin-5′-trifosforic (UTP) **352**, 559
— β-ureidopropionic *774*, *857*
— uric 183*, *856*
— uridilic, v. UMP
— urocanic *821*
— uronici 411
— vaccenic 431
— xantilic **187**

Acidemie
— izovalerianică 816
— metilmalonică 706

— propionică 706
Acidurie
— argininosuccinică 826
— propionică 706
— xanturenică 813
Acidoză 761, 816, 928
Aciladenilat **192***, *697**
Acilcarnitina *703*
Acilfosfat 317
Acilgliceroli 438
Acimen 466
Adenaza *855* şi *u.*
ACP, v. proteină purtătoare de acil
ACTH, v. hormon adrenocorticotrop
Acrodextrine 398
Actină 102*, 103*
Acrozina 269
Actinomicina D *848** şi u., *878*, *879**
Adenina 181, **182***
— baze perechi **219***, 224*, 225*
— catabolism *856*
— structură 182
Adenilat ciclaza 534 şi u., 714 şi u.
Adenintiometilpentozid 187
Adenilsulfat *777 şi u.*
Adenohipofiza 525 şi u
Adenozina 186, *856*
— analogi **188**
— degradare *856 şi u.*
— structură **186**
S-Adenozilmetionina **187**, 347, *729*, *771*, *777*, *794*
S-Adenozilmetionina : L-homocisteina S-metil transferaza 347
S-Adenozilmetionina : guanidinoacetat N-metil transferaza 347
Adiuretina, v. Vasopresina şi ADH
Adrenalina 348, *527**, 534 şi u., *764* şi *u.*
Adrenocorticotropine 525*
Adrenosteron **493** şi u, 505 şi u. 537 şi u.
Aglicon 419 şi u.
Agmatina 793, *796**
Alameticine 97
Alanina 23*, 24*, 45, 46 şi u.
— biosinteză *774* şi *u.*
— catabolism *775*
— răspîndire 29
β-Alanina 325, *774 şi u.*, *857*
Alanin racemaza 335
Alantoina *856*
Albinism *771*, *812*
Albumina (e) 102*, 103*
Alcaptonuria *711*, *811 şi u.*
Alcool
— butilic *606*
— etilic *601 şi u.*, *603 şi u.*, *605 şi u. 607**
Alcool dehidrogenaza sau Alcool : NAD-oxidoreductaza 103*, 148, **240***, 245, 359 şi u.
Aldehidă
— acetică 326, *604 şi u.*
— 3-fosfoglicerică **378**, 554, *589 şi u.*, *603*, *611 şi u.*
— glicerică 46
— malonică 252
Aldehid oxidaza 662
Aldohexoze 380 şi u.
Aldolaza 234, 257, 597 şi u.
Aldoze 380 şi u., 383
Aldosteron 502 şi u., *528**, *725*, *726**
Aldotetroze 378
Alitesina 75*
Alytes obstreticans 74
Amanita phalloides 93, 94
Amanitine 93
Amicetoza 189
Amidoalcooli 49
Amidon 396, *566*
— acţiunea amilazelor asupra 601 şi u.
— biosinteză 561
— derivaţi ai 396, **397***
— reacţii cu iodul 395
— structură 396, 397
Amilaza (e) 286 şi u., 288, **311**, 601 şi u.
Amidon fosforilaza 562
Amiloza 396
Amilopectina 385, **397**
Aminoacidurie 771 şi u., *819 şi u.*
Aminoacil sintetaza 862
Aminoacil adenilaţi 192, *697*, *862**
Aminoacil tRNA 860 şi u.
— legare la ribozomi 864 şi u.
— sinteză în citoplasmă 863 şi u.
Aminoacil tRNA sintetaza (e) 860 şi u.
Amilodextrine 398
Aminoacid oxidaza 103*, 272, *662*

Aminoacizi 21 și u.
— aciclici **24***
— activitate optică 44
— alifatici 22
— antipozi optici 47 și u.
— aromatici 34
— activare a 63, 350
— bibazici **26***
— biosinteza *772 și u., 774 și u., 780 și u., 782 și u., 786 și u., 798 și u.*
— clasificare 22, 24
— configurație absolută 47 și u.
— cromatografie a 56, 57* și u., 59
— decarboxilare a *769 și u.*
— degradare a *773, 779, 789 și u., 793, 803 și u., 808 și u., 812 și u., 815 și u., 818 și u.*
— dereglări ale metabolismului *771 și u.*
— derivați ai 53 și u.
— determinare 57
— dezaminare 767 și u.
— diaminomonocarboxilici 22, 31
— esențiali 23, 34
— esteri ai 50 și u., 64 și u.
— heterociclici 22, 34
— hidroxiaminoacizi 25, 28 și u, 30, 38
— încorporare în proteine *860 și u., 867 și u., 870** și u.
— ionizare 40 și u., 43 și u.
— monoaminomonocarboxilici 22
— monoaminodicarboxilici 22, 31
— neesențiali 23
— hidroxiaminomonocarboxilici 22
— polimeri ai 65
— proprietăți fizice 39 și u.
— proprietăți chimice 49 și u.
— punct izoelectric **44***
— reacții generale 49 și u., 52 și u.
— stereochimie 45 și u.
— structură amfoteră 40 și u.
— substituire în Hb 159*, 160
— tioaminoacizi 22
— transaminare 770
— transamidinare 770 și u.
— transmetilare 770 și u.
Aminoaciladenilat 192, *862 și u.*
Aminoglucide 289, **290*** și u.
AMP, v. acid adenozin-5′-monofosforic
ADP, v. acid adenozin-5′-difosforic
ATP, v. acid adenozin-5′-trifosforic
ATP : piruvat fosfotransferaza 594
ATP : D-glucozofosfotransferaza 350
Amital, în catena respiratorie 667*
Amoniac v. ciclul Krebs-Henseleit
Amonozamina 189
Analogi de substrat 250
Anemia 158
— Biermer 158
— drepanocitară 158
— falciformă 159
— hemolitică 592
— pernicioasă 158
Androgeni 492 și u., **494***
Androsteron 493, 503
Anhidride mixte 65
Angiotensina, I și II 76
Angiotensinogen 76
Anser anser 92
Anserina 34, 68
Antibiotice 97
Anticorpi 102*
Anticodon 209 și u., *865 și u.*
Antimicina *A* 666, 667*
Apoenzima **315**
Apoferitina 307
Aporepresori *883 și u.*
Antipozi optici 45 și u.
Antivillikinina 98
Antuitrina *S* 499
Arabani 388, 402, 403
Arabinoza 378, **379**
Arbore filogenetic **178**, 220
Arginaza 33
Arginina 23, 26, *771, 793*
— biosinteză *793*
— ciclul ureogenetic *822 și u.*
— catabolism *796*, 824 și u., 825*
— decarboxilare 793
— răspîndire 32
Arginin-vasopresina 90 și u.
Argininosuccinat *822 și u.*
Ascorbat oxidaza 675
Asparagina 26*, 31
— biosinteza *780 și u.*
— catabolism *781 și u.*
— răspîndire 31
— rol în metabolism *781**
Asimilația clorofiliană 546 și u.
— bacterioclorofiliană 558
Aspartat transcarbamilaza 283
Aspergilopeptidaza *A* 120
Aspergillus oryzae 311

Aspergillus niger 271, 325, 327, 406, *731*
L-Alanin : 2-oxoglutarat aminotransferaza 334
L-Aspartat : 2-oxoglutarat aminotransferaza 240, 334
Atractilozid *653*
Aureomicina *878 și u.*
Avidina 291, 328
Azaserina 35*, *830*
Azida, în catena respiratorie 667 și u.
Azotobacter vinelandii 173

B

Bacillus anthracis 21, 93
aerosporus 94
brevis 94, 96
cereus 228
licheniformis 94, 96
macerans 398
mesenteroides 357
polimixa 94
megaterium 93, 228, 370, 451
subtilis 21, 93, 228, 271, 309, 312, *846*
Bacitracina 34, 96
Bacterioclorofila (e), *a* și *b* 167 și u.
Bacteriofagi
— ΦX174, 228, *841* și *u.*, *843**, *846*, *849*
— 5P8 *849*
— T2 229, *850*
Barieră energetică 271 și u.
Baze azotate purinice 181 și u., 218 și u., 348 și u., *827 și u.*, *831 și u.*, *855 și u.*, *856 și u.*
Baze azotate pirimidinice 181 și u., 218 și u., 225, 348 și u., *833 și u.*, *856*, *856*
Baze azotate rare sau neobișnuite 204 și u.
Baze azotate perechi 219, 233 și u., 226
Betaine 348
Beri-beri 321
Benzochinona 367
Benzoil-L-argininamida 263
Benzoil-arginina 263
Benzoil-L-tirozilglicinamida 265
Bilirubina *890*, *891*
Biliverdina *890*, *891*
Biocitina 326*, 328, 683
Bioenergetica v. Fosforilarea oxidativă
Bios IIA și IIB 325
Biosinteza
— alaninei 774
— acidului ascorbic *615 și u.*, *617*
— argininei *793 și u.*
— acidului aspartic *780 și u.*
— fenilalaninei *798 și u.*, *801 și u.*
— acidului glutamic *782 și u.*
— acidului nicotinic *813 și u.*
— acizilor biliari *721*, *722**
— acizilor grași *681 și u.*, *684 și u.*, *686**, *688** și *u.*, *692*, *694 și u.*
— acidului deoxiribonucleic *837 și u.*, *840 și u.*, *843**, *845*
— acidului ribonucleic *846 și u.*, *851 și u.*, *853*
— amidonului *561 și u.*
— cauciucului *735*
— carotenoizilor 741 și u., 744*
— celulozei 574* și u.
— cerebrozidelor *755 și u.*
— colecalciferolilor *733*, *734**
— colesterolului *716* și u., *717**, *718** *și u.*
— deoxiribonucleotidelor *835 și u.*
— exopolizaharidelor *582 și u.*
— fosfatidilcolinei *749 și u.*
— fosfatidilserinei *751 și u.*
— gibberellinelor *733*, *734 și u.*
— glicanilor *575*, *577** *și u.*
— glicocolului *772* și *u.*
— glicogenului 563 și u., 568 și u.
— hidroxiprolinei *784 și u.*
— histidinei *819 și u.*, *820**
— hormonilor estrogeni *726**, *729*, *730**, *732**
— hormonilor gestageni *726**
— hormonilor androgeni *726**
— izoleucinei *816*, *817** *și u.*
— lactozei *561*
— leucinei *818 și u.*
— lizinei *786 și u.*, *789 și u.*
— oligozaharidelor *558* și u.
— peptidoglicanilor *578* și u., *580*
— progesteronului *730 și u.*
— proteinelor *858 și u.*, *862 și u.*, *871 și u.*, *873**, *875** *și u.*, *886*, *888*
— pirimidinelor *833* și *u.*
— purinelor *827* și *u.*
— serinei *775 și u.*, *778*
— sfingomielinelor *752*, *753 și u.*
— steroizilor *726 și u.*, *729*, *730**
— tirozinei *804** *și u.*
— trehalozei *561*

— urcii *822 şi u., 825**
— valinei *815**
— zaharozei 560
Biotina 325, **326***, 356
Biotinavidina 328
Biotinilenzima 329, *683*
Biotinsulfonă **327***
Boli moleculare ereditare 771, 797, 805, 808, 813, 814, 822, 890
Bombesina 74, 75*
Bombina bombina 74
B. variegata variegata 74
Bradikinina 67, 80
Bromcian 115
Bromhemina 155
Bromelaina 246, 602
Bromura de 2-hidroxi-5-nitrobenzil 252
Bufo bufo 92, 506
Bufogenine 506, **507***
Bulbogastrona 99
2,3-Butilen glicol *605*
Butiril CoA dehidrogenoza 367

C

Cadaverina 26*, 32, *769, 793, 796**
Cafeina 181
Calea acidului glucuronic *615 şi u.*
Calea Embden-Meyerhof *585 şi u.*
Calea Entner-Dudoroff *614 şi u.*
Calea pentozofosfaţilor *608 şi u., 612**
Caeruleina 79, 80
— răspîndire 79
— rol 80
Calcitonina v. tirocalcitonină **89**, 526*, 739
Calcitonina D 90
Calcitonina M 89
Canavanina 36*
Candida mycoderma 287
Carbamil fosfat 283, *822 şi u.*
— biosinteză *822 şi u.*
— structură 283, *823*
— în formarea ureei *822 şi u.*
— în biosinteza pirimidinelor *834 şi u.*
Carbamilfosfat sintetaza I şi II *822*
O-Carbamil-*D*-serina 36*
Carbhemoglobină 161
Carbonicanhidrază 313
Carboxibiotina 356
N-Carboxibiotinilenzimă 330, *683*
Carboxidismutază 553
Carboxihemoglobină 162 şi u.
Carboxipeptidaze *A* şi *B* **102***, 260, 267
Cardilipina 446
Carnitina 683, *703*, 770*
Carnozina 34, 67
α-Caroten 510, *744 şi u.*
β-Caroten 510, *744 şi u.*
γ-Caroten 511, *744 şi u.*
Carotenoizi 167, **509** şi u., 547, *741 şi u.*
Catalaza 103*, 153, 174*, 239, 240, 258, 312, 373 şi u.
Catena de oxidare celulară 652 şi u., 656 şi u.
Cazeina 102*, 103*, **306**
Ceara de albine 443
Ceara de Carnauba 443
Ceara de Montana 444
Cefaline. v. Fosfatidiletanolamina
Celulaze 288
Celuloza 385, 404, 405 şi u., *574 şi u.*
— derivaţi ai celulozei 574 şi u.
Celobioza 384 şi u., **386***, 405
Celotrioza 393
Cenapse lipoproteice 103
Ceramid(e) 452 şi u., **457**, *754 şi u.*
Cerazine 456
Cerebrona. v. Frenozina
Cerebrozide 455 şi u., *752 şi u.*
Cerebrozidoze *759 şi u.*
Cerebrocupreina 103*, 152
Ceride 443
Ceruloplasmina 152, 290, **292***, 293
Ceruri 443, 444
Cetoheptoze 382
Cetohexoze 380 şi u.
Cetonemie *709, 761*
Cetonurie *709, 761*
Cetopentoze 379 şi u.
3-Cetopentozo-1,5-difosfat **552**
17-Cetosteroizi 504 şi u., *505**
Cetoze 709
Characeae 165
Chargraff, regula lui 223
Chemiosinteză *545 şi u.*
Chilomicroni 304
Chitobioza 387
Chlorella 318
Chlorobium 173, 375
Chlorophyceae 165
Chromatium 173, 375

Chrysophyceae 165
Chimotripsina 102*, 104*, 119, 252 și u. **255*** 259, 263, 287
Chimotripsinogen 263, **265**, 266, 267*
Chimozina 239, 259
Chinone. v. și ubichinone
Chinurenina v. Kinurenina
Chinureninaza v. Kinureninaza
Chitina 387, 404
Choleglobina *890*
Chondrozamina 389
Ciancobalamina 369 și u.
Cianopsina 746 și u.
Ciclohexandiona 252
Ciclul acizilor glutamic și aspartic *645 și u.*
Cicloheximida *878*
Ciclul Calvin 555
Ciclul Hatch-Slack 556 și u.
Ciclul Krebs *625*, 634
— bilanț energetic 635
— control și reglare 646 și u.
— răspîndire 636
— rol în celulă 637 și u., 639, 641, 703
Ciclul Krebs-Henseleit *822 și u.*
Ciclul glioxilatului *643 și u.*
Ciclul pentozofosfaților 565
Ciclul Randle *763 și u.*
Ciclul ureogenetic 33, 822
Ciclul Utter 568
Circulația enterohepatică 482
Cistationina 37, 335, 777
Cistationinuria 780
Cisteamina 353
Cisteina 23*, 25*, 45
— biosinteza 777
— catabolism 779 și u.
— răspîndire 25, 29
Cistindisulfoxid 37*
Cistein liaza 335
Cistina 23*, 25*, 335
Cistinuria *771, 795 și u.*
Cistron 883 și u.
Citidina 185
Citidin-5′-difosfat colina **198***
Citidin-5′-difosfat diglicerid 199 și u.
Citidin-5′-difosfat etanolamina **198**, 353
Citidindifosfatglicerol **197***
Citidindifosfații 353
Citidindifosfatribitol **198***
Citocromi 102*, 103*, 153, 170, 371
— a 171, **174***, 371 și u., 656 și u., 666 și u., **665***
— a_3 171, 371 și u., **665***
— b 171, **174***, 371 și u., 521, 656 și u., **665***
— b_2 171, 371
— c 171, 174*, **175**, **177**, 371 și u., 521, 656 și u., 666 și u., **665***
— c_1 371 și u., 656 și u., **665***
— c_2 171, 371 și u.
— c_3 171, **172**
— c_6 173
— c′ 173
— C_{553} 173
— C_{555} 173
— C_{556} 173
— f 173, 547
— P_{540} 678 și u., 707 și u.
— clasificare 171
— potențial redox **651*** și u., **656*** și u.
— spectre de absorbție **665*** și u.
— în fosforilarea oxidativă 667, 668 și u.
— în fosforilarea fotosintetică 550 și u.
Citocrom oxidaza **103***, 656 și u.
Citocrom-c-reductaza 367, 521, 660 și u., 666*, 678
Citocrom C peroxidaza 674 și u.
Citozina 181, **184***, *774, 857*
Citral *a* și *b* 466, 467
Citrat sintaza *628 și u.*
Citrat oxalilacetat liaza 356
Citrulina 33, **37***, *822 și u.*
Citrulinemia *826*
Clostridium pasterianum 312, 375
Cloramfenicol 878, 879
Clorhemina 155, 162
Clorofila(e) a, b, c, d, e 164 și u., 546 și u., *707* și u.
— în fotoliza apei 549 și u.
— în fotosinteză 548 și u.
— proprietăți 167
— răspîndire 164 și u., 546
— structură 167
Cloroflavina 366
Cloroplast(e) 164, 215, 546, 547
Cloroplastine 153, 164, 547
Clorura de dansil 55
p-Cloromercuribenzoat 251
Cobalamina(e) 370 și u.
Codecarboxilaza, v. Tiaminpirofosfat
Cod genetic 868 și u.

— degenerescența 868
— descifrare 867 și u.
— tabelul cu codoni 868
— universalitatea 869 și u.
Codon 865 și u.
— amber 868
— ochre 868
— fără sens 868, 877 și u.
— de inițiere 868, 871
— de punctuație 868, 871, 877 și u.
— de terminare 868, 871
Coenzime 315 și u.
— definiție 315, 361
— proprietăți 316, 318, 319, 322, 323, 343, 344, 346, 349, 354, 358, 363 și u., 373 și u.
— răspîndire 315 și u., 361 și u.
— rol 315 și u., 320, 321, 331, 338, 356, 361, 368, 376
— structură 316, 318, 319, 322, **326*** și u., 332, 333, **340*** și u., 349, 354, 358, 362 și u., 372
Coenzima *A* 185, 353, 775
— funcții 354 și u.
— în metabolismul glucidelor 626 și u.
— în metabolismul acizilor grași 681 și u.
— structură 354
Coenzima Q, v. și ubichinone 520, 661, 803, *806**
— structură 520, 661 și u.,
— rol în transportul de electroni 521, 663 și u., 665 și u., *667**
Coenzime cobamidice 368 și u., **369**
— flavinice 361 și u.
Cofactori enzimatici 315 și u.
Coherina 98
Colagen 100, 102*, 103*, 131 și u., 137
Colecistokinina 78, *721*
— răspîndire 78
— rol 78, 721
— structură 78
Colecalciferol **486***, *736*
Colesterol *716 și u., 721 și u., 736 și u.*
— biosinteza *716 și u.*
— catabolism *721 și u.*
— originea atomilor 720
— răspîndire 305
Colina 353, 445, *750* și *u.*
Colesterolesteraza 721
Colicistochinina 78
Colinearitatea codului genetic 871 și u.
Colinfosfolipide 446 și u.
Complex M i c h a e l i s-M e n t e n 271 și u., 274 și u.
Compuși macroergici 648*
Conalbumina, v. ovotransferina 103*, 152, **308**
Condroitina 415 și u.
Condroitinsulfat 100, 415, 760
Conformație în lanț 145
Coproporfirina *889* și u.*
Coproporfirinogen *889* și u.*
Cordicepina 188, 189
Corpi cetonici 708 și u., 761 și u.
Corticotropina 83 și u.
Corticoliberina 73, 532*
— α_1-CRF 73
— α_2-CRF 73
— β-CRF 73
Corticosteroizi 528
Corticosteron 501, **726*** și u.
Cortizol 501 și u., *726* și u.*
Cortizon 501 și u. *726* și u.*
Creatine 347, 770
Criste mitocondriale 652
Cromatofori 164, 558
Cromatografie 56 și u.
Cromoproteide 103, 153, *888 și u.*
— apirolice (neporfirinice) 153
— pirolice (porfirinice) 153, *885 și u.*
Crotonil ~ SCoA 685 și u.,
Cruorina(e) 153
Cupru 911
Cupruenzime v. Metaloproteine
Cupruproteine v. Metaloproteine
Cyanophyceae 165
Cyprinus carpio 92

D

Dansil, clorura de 55
Dansilarea aminoacizilor 56 și u.
Deacilaze 687, *710*
Decarboxilarea aminoacizilor *769*
Decarboxilarea oxidativă *769*
Dedublare genetică 160
Degenerarea codului genetic 868 și u.
Degradarea
— aerobă a glucidelor *625 și u.*
— anaerobă a glucidelor *584 și u.*
— bazelor azotate *854* și u., *856**, *857**
— oxidativă a glucidelor *584 și u.*

7-Dehidrocolesterol 486*
11-Dehidrocorticosteron 501 şi u.
Dihidroergosterol 485*
Dehidroretinol 746 şi u.
Dihidrotachisterol **487***
Dehidrogenaze 367, 707
Deleţie 885 şi u.
Dendrostomum zostericolum 308
Deoxiadenozina **186**
Deoxicorticosteron 502 şi u., 726* şi u.
Deoxicitidina 185
Deoxiguanozina 186, 835 şi u.
Deoxinucleotide 190 şi u.
Deoxinucleozide **186*** şi u., *188**
Deoxiribonucleaza I, II 854
Deoxiribonucleoproteide 103*
Deoxiribonucleotide **190**
Deoxiriboza 180, **379**
Deoxitimidina **185**
Dermatan sulfat 416 şi u.
Desensibilizare 285
Desmetillanosterol *719*
Desmoglicogen 401
Desmosterol 718 şi u.
Desmozina 32, **33**
Determinanţi „O" antigen *583 şi u.*
Dextran 398 şi u., 400
Diabet aloxanic 763 şi u.
Diabet insipid 623 şi u.
Diabet zaharat 620 şi u., 709, 761
— renal 622
— idiohipofizeal 623
Diacilglicerol 246, *750 şi u.*
Diacetil *605 şi u.*
Diatomeae 165
Diciclohexilcarbodiimida **66*** şi u.
Diciclohexilurce 66*
Dicroism în infraroşu 146 şi u.
Dicumarol 521
Difracţie de raze X 179, 201, 223
Digestia proteinelor *887*
Dipeptide 67 şi u.
Digitonina 421
Dhidroporfirină 372
Dihidroretinol 513
Dihidrosfingenina 452
Dihidrotimina 857
Dihidrouracil *857*
Dihidroxiacetona 378
Dihidrouridina 205
Dihidroxiacetonfosfat 378, 554, 589 şi u., *653* şi *u.*
1,25-Dihidroxicolecalciferol *488, 733*
24-25-Dihidroxicolecalciferol *488 şi u., 733 şi u.*
Dihidroxifenilalanina 37*
Diiodtirozina 37*
Diizopropil fluorofosfat 256
Dimetil glicocol 348
Dineina 102*
2,4-Dinitrofenol 671 şi u.
2,4-Dinitrofluorbenzen 54 şi u.
Dinophlagelateae 165
Dioxigenaze 311
Dispersie optică rotatorie 147
Diterpene 468
Ditiotreitol 251
Dizaharide 377, 385
— biosinteza *559 şi u., 561*
— proprietăţi 385 şi u.
— răspîndire 385 şi u.
— structura **386,**
DNA v. acid deoxiribonucleic
Dolicolfosfaţii *575 şi u.*
Dopamina 810 şi u.
Dopachinona *810*
Dopacrom *810*

E

Ecdizona(e) 480 şi *u.*, **481***, *506, 724*
Echinenona 511
Efect Cotton 146 şi u.
Efect Donnan 111
Efect hipercrom 201, 229
Efect hipocrom 230
Efect Mössbauer 151
Efectori ai biosintezei proteinelor *882*
Efector alosteric 151, 284
Elastaza 255*
Elastina 102*
Electrod de referinţă 650 şi u.
Electroforeza 107
Eledoisina 74, **75***
Eledone moscata 74
Eledone aldovandri 74
Elemente minerale *893* şi *u.*
Emulsina 234
Enniantina *A* şi *B* **97**

EnoilACP-hidraza 698 și u.
Enolaza 103*, **312**, 593, **594***
Enterocrinina 99
Enteroglucan 99
Enterokinaza 262
Enzime 233
— alosterice 282 și u.
— analogi de substrat 253 și u., 262 și u.
— biosinteza *882 și u.*
— centru activ 248 și u., **255***, 259, 260
— cinetica de reacție 271 și u.
— clasificare 241 și u.
— complecși artificiali 272
— complexe ES 249, 256, 271 și u.
— constante de reacție 274 și u.
— denumiri de lucru 240
— domenii optime de activitate 280 și u.
— forme moleculare multiple 259 și u., 285
— inhibitori 261, 277, 279 și u.
  — competitivi 277, **278***
  — naturali 267
  — necompetitivi 277
— homotropice 283, 284
— homotropic-heterotropice **284**
— heterotropice 283, 284
— izoenzime 259
— oligomere 258
— reacții lente 272
— reglatoare 282 și u.
— reprezentări grafice ale vitezei de reacție 274, 275, 279, 280 și u.
— structura 236 și u., 256 și u.
— substrate sintetice 261 și u.
— utilizare 286 și u.
  — în botanică și chimia agricolă 287
  — în chimia alimentară 286
  — în industria chimică 287
  — în industria medico-farmaceutică 286, 288
— viteze de reacție 274, 275 și u., 281 și u.
— zimogene 261, 263 și u., 267
Epimeraze 246
Epizomi 220
Ergocalciferol 485*, *736*
Ergosterol 485*, *736 și u.*
Ergozomi 879
Ergotioneina 34
Eriodictina 424
Eritroza **378**, **553***, *611* și u., *800*
Eritrocupreina 152
Eritrodextrine 398
Escherichia coli 94, 185, 209, 215, 226, și u. 309 și u., 318, 355, **368***, 370, 627, 684, 815, 835 și u., 855 și u.
Estrona **730*** și u., 732
Estradiol **730*** și u.
Estratriol **730*** și u.
Estrogeni 494 și u., 497 și u.
Etanolamina 445
Etanolaminfosfolipide 448
N-Etilmaleimida 251
Etolide 444
Exocitoză 125, 880
Exopolizaharide 582 și u.
Exponenți de aciditate 40 și u.
Euglena gracilis 173
Eumelanine 809 și u.

F

Factori de eliberare 70, 71, 72 și u.
Factori de sulfatare 99, 100
Factor timidinic 100
Factor intrinsec 368 și u.
Factor lipocaic 766
Factor lipotrop 765
Factori de elongare a catenei polipeptidice *874 și u.*
Factorul *R* 878
Factori de reglare 881
Factor Schwartz 766
Fag v. bacteriofag.
FAD, v. Flavinadenindinucleotid
Faloidina 93
Felinina **36***
Farnochinona **519***
Farnezol și derivați 467 și u., *717 și u., 743 și u.*
Fastigiatina 70
Fenilalanina 23*, 27*, 34, *769, 798, 806*
— biosinteza *798* și *u., 800, 803* și u.
— catabolism *804** și *u., 806* și u.
— metabolism 769
Fenilalaninhidroxilaza 150
Fenilcetonuria *805*
Feniltioizocianat 53
Feniltiohidantoine 54 și u.,
Fenoloxidaze 675
Feomelanine *809 și u.*

Feritina 152, **307**, *890*
Feredoxina(e) 311, **312** şi u., 375 şi u., *707 şi u.*
— în fotosinteză 376
— în fixarea azotului 376
— proprietăţi 375, 376
— structură 375
Feritina 102*, 103*
Fermentaţia 601 şi u. **607***
— alcoolică 601 şi u., **607***
— aceton butirică 606 şi u., **607***
— butirică 606 şi u., **607***
— citrică 606 şi u.
— lactică 336, 604 şi u., **607***
— propionică 606, **607***
Fetuina 290, 291*, 294 şi u.
Ficina 239, 766
Fibrinogen 102*, 103*
Fibroina 103*, 131
Filomedusina 75*
Fiselamina 74
Fitohemaglutinine 291
Fitol 165, **468**, 706
Flavinmononucleotid (FMN) 362, 658 şi u.
— proprietăţi 365 şi u., 658 şi u., 665 şi u., 667 şi u.
— structura 364, **368***, 658 şi u.
Flavinadenindinucleotid (FAD) 185, 362, *626 şi u., 658 şi u., 768 şi u.*
— biosinteza 365
— proprietăţi 365 şi u., 656 şi u., 662 şi u., 665 şi u., 667 şi u.
— structura 364, **368***, 658 şi u.
— în fosforilare 667 şi u.
— în ciclul Krebs 632 şi u.
Flavoproteine, flavinenzime 658 şi u.
Fluorodinitrobenzen, v. reactiv Sanger
Folliberina 532*
Forbina 306
Forme izohormonale 127
Forme prohormonale 90
Formil activat 344
N-Formilkinurenina 812
N-Formil-metionil-*t*RNA 871 şi u., 873 şi u.
Formiltetrahidrofolat 872 şi u.
Forţe de atracţie 139* **140***
— electrostatică 138, **139***, 249
— van der Waals 139, **140***, 249
Fosfagen, v. Creatinfosfat
Fosfataza alcalină 199
Fosfatide 445
Fosvitina 306
Formilglicinamid ribonucleotid 828 şi u.,
Formilporfirina 371
Fosfatidilcolina 447, *749 şi u.*
Fosfatidiletanolamina 448, *749 şi u.*
Fosfatidilserina 448, *749 şi u.*
Fosfoadenililsulfat 778 şi u.
Fosfoarginina 26*, 32
Fosfocreatina **648***
Fosfodiesteraze 534, *714*
Fosfoenolpiruvat *593, 594, 642 şi u.*, **648***
Fosfoglicerol mutaza 593
Fosfofructokinaza 588
Fosfogliceride v. Glicerofosfolipide
Fosfoglucomutaza 587
Fosfolipaze, *A*, *B*, *C*, *D* 756 şi u.
Fosfolipide 305, 445 şi u.,
Fosfomonoesteraze 757 şi u.
4'-Fosfopanteteina 684
Fosfoproteine 103, **306**
Fosforilare
— ciclică *558*
— fotosintetică *550*
— la nivelul substratului *632*, *668*
— în catena respiratorie *669* şi u.
— neciclică *558*
— oxidativă *632* şi u., *668*
— v. şi mecanismul fosforilării 671
5-Fosforibozilglicinamida 346
5-Fosforibozil-*N*-formilglicinamida 346
Fosfopiridoxal 769
Fosfoserina 29, 306 şi u., *684*, *775*
5-Fosforibozil-1-pirofosfat 350, *828 şi u.*, *834*
Fosforilaza(e) *a* şi *b* 253, 534 şi u., 567, 586
Fosfataza fosforilazei 534 şi u.
Fosforibozinglicinamid transferaza 826 şi u.
5-Fosforibozil glicinamida 829 şi u.
5-Fosforibozil *N*-formil glicinamida 829*
Fosforilcolina 750 şi u.
Fosforilcolin citidil transferaza 749
Fosvitina 103*
Fotofosforilare ciclică 558
Fotosinteza 164, 546 şi u.
— fixarea dioxidului de carbon 548 şi u.
— ATP şi 556 şi u., 558
— chinonele şi 547
— citocromii şi 547
— eficienţa 558
— fixarea dioxidului de carbon 552 şi u., 555

— feredoxinele și 550 și u.
— flavinele și 547, 550 și u.
— nucleotide și 549 și u. 555
— raporturi energetice 549 și u., 557
— transport de electroni 549 și u,. 552 și u.
— pigmenți și 164 și u., 547 și u.
Fotoliza apei 549, 550
Fracțiunea calcemică *A* 127
Frenazina 453, 456
Fructozo-6-fosfat 553 și u., 588 și u.
Fructozo-1,6-difosfat 554 și u., 588, 597 ș u.
Fructozemia 619
Fucoidan 417
Fucoza 290, 381
Fucoxantina 167
Fumarat hidrataza 633
Fumaraza 238, 633
Fusarium oxysporum 97, 98

G

Gadus luscus 92
Gadus morrhua 92
Galactani 403, 407
Galactomanani 387
Galacturonani 407
Galactolipide 456
Galactozamina 458
Galactoza 290, 380, 381*, 456, 458, *598 și u., 599**
Galactozemie 565
β-Galactozidaza 883 și u.
Galactozid permeaza 884
Galactozo-1-fosfat 352
Gallus gallus 92
Gangliozide 457 și u., 459*
Gangliozidoze *759 și u.*
Gastrina, I și II 78, 79
Gelatina 32
Gel filtrare 59, 60
Gena operator 882
Gena reglator 882
Gena structurală(e) 882 și u.
Gentiana lutea 385, 386
Gentianoza 392
Gentiobioza 385, 386
Geraniol 463 și u., *717 și u.*
— derivați 465, *717 și u., 743 și u.*
— rol în metabolism *717 și u., 743 și u.*
— structura 463, 465
Germo allaalunga 92
Gibberelline 468 și u., 469*, 529*, *733* și u.
Gibberella fujikuroi 469
Ginko biloba 175 și u.
Gliadina 32, 102*
Glicani 575 și u.
Glicerol kinaza 239, 287
Gliceraldehida 378
Gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza 590
Glicerol 590
Glicerol ester hidrolaza 246
Glicerol fosfat 590 și u., *653 și u.. 714, 723*
Gliceride *714*
Glicerol ester hidrolaza *757* și *u.*
Glicerofosfolipide 446
Glicina, v. Glicocol
Glicocol 22*, 346, 348*, *772 și u.*
Glicinamid ribonucleotide 346, *828 și* u.
Glicogen 385, 400 și u., *534, 563.*
— biosinteza *563 și u., 568 și u.*
— catabolism *586 și u.*
— metabolism *570 și u.*
— structura 400 și u., 401
— acumulare 570 și u.
Glicogen fosforilaza *586* și *u.*
Glicogenogeneza 559 și u.
Glicogenoneogeneza 563 și u., *568* și *u.*
Glicogen sintetaza 534, *566* și *u., 573* și *u.*
Glicogenoze 570 și u., 573*
Glicolipide 451, 452
— proprietăți 452
— răspîndire 452 și u.
— rol 452
— sinteza *754* și u.
— structura 453, 454, 455
Glicoliza
— aspecte generale 584 și u.,
— enzime participante 584 și u.
— mecanism 586 și u., 597 și u., 600*
— producere de energie 596 și u., 600*
— v. calea Embden-Meyerhof
Glicopeptide 575 și u.
Glicoproteine 103, 271, 289 și u.
— α_1-acid glicoproteine 290
— activitate de grup 291
— activitate hormonală 291, 298 și u.
— plasmatice 291
— de rezervă 306
— din secreții 291
— țesut conjunctiv 291

— urinare 291
— vegetale 291
Glicoproteina II 291
Glicozilare 561 și u.
Glicozide 419 și u.
Glioxilaza 319
Glioxizomi 676 și u.
Glycine max 315
Globina 153, 155, 157
Globulina(e) 103*, 104*
Glucagon 77, 83, *526**, 534 și u.
— rol în organism 762 și u.
Glucanfosforilaza (α) 336
Glucomanani 387
Glucozamina 289, 290* și u.
Glucozo-1-fosfat 352, 534, 559 și u., 615 și u.
Glucozo-6-fosfat 534, 608
Glumitocina 91
Glutamina 26, 645 și u.
— biosinteza *645* și *u.*
Glutation oxidat 68, 69
Glutation redus 69
Glutation reductaza 69
Glicozide 419 și u.
— alifatice 419
— aromatice 419, **420***
— cianogenice **420***
— antracenice 421
— fenantrenice 421 și u.
— antocianidinice 423
Glutamat decarboxilaza 334
Glutamat dehidrogenaza 104*, **258**
Glutamat oxaloacetat transaminaza 244, 286
Glutamat piruvat transaminaza 286
Glutamat racemaza 335
Glutamat transaminaza 770
Glutamin sintetaza 782 și u.
Glutaril-SCoA *791* și *u.*
Glutation 318 și u.
Glutation reductaza 318
Glutation dehidrogenaza 318, 320
Gonadoliberina 74, 532*
Gonadotrofine corionice 291, 298, 299*
Gramicidine 21, 34, 94, 95
Grana 546 și u.
Granule de zimogen 880 și u.
Grăsimi neutre 425 și u.
Grupări prostetice 315 și u., 666 și u.
Guanidinoacetat 347
Guanozinfosfații 353
Guanina 181, 182*, 856
Guanozina 186, 856 și u.
Guanozindifosfat manoza (GDP-Man) **194***
Guma arabică 409, **410***
Gume 388, 409, **410**
Guanozindifosfat *L*-fucoză **194***

H

Hadacidina **848***
Halosulfatide 460 și u.
Haptoglobuline 290, 291, 297
Helix aspersa 176, 177
Hem 153 și u., 156 și u.,
Hem sintetaza 888
Hematina 155, 162
Hemeralopie 747 și u.
Hemeritrina 151, 308
Hemiceluloza(e) 410 și u.
Hemocianine 113, 151
Hemocromogen 163
Hemoglobina(e) **102***, **103***, **104***, 113, 144, 152, 153, **174***
— fetale 158, 160
— embrionare 158, 160
— Hb*A* 158
— HbA_2 158
— HbA_3 158
— Hb*C* 160
— proprietăți 160
— rol 161 și u.
— structură 153 și u., 158 și u., 174
— substituții în aminoacizi 159, 160
Hemoglobinopatiile S, C, E 159 și u.
Hemoproteine 371
Hemosiderina 308
Hemovanadina 152
Hepatocrinina 723
Hepatotoxine 765
Heparina 388, 400, **418**
Heparin sulfat 760
Hepatocupreina 152
Heptoze **382**
Hesperidina 424
Heteropolioze 406 și u.
Heteropolizaharide 406 și u.
Heterozide 419
Hexokinaza 565 și u., 620 și u.
Hexozamina 289, 290 și u.

Hexoze 380, **381***
Hexozofosfatizomeraza 587
Hialuronidaza 288
Hidantoine 54 şi u.
Hidrochinone 367
Hidrogenbacterii 546
Hidrohemina 155
Hidrolaze 239, 243*, **246**
Hidroliza proteinelor 114
Hidroporfirina 168
Hidroxiaminoacizi **35*** şi u.,
11-Hidroxiandrosteron 503
25-Hidroxicolecalciferol *488* şi u.
3-Hidroxikinurenina 812
Hidroxikinureninemie 813
Hidroxilizina 26
Hidroximetilglicocol 348
Hidroximetilglutaril ~ SCoA 717
Hidroximetilsarcozina 348
Hidroxitriptofan *813*
Hidroxiprolina 28, *784 şi u.*
Hill, reacţia lui 549
Hiperglicinemie 773 şi u.
Hiperlizinemie 826
Hiperprolinemie 786
Hipocalcemie 761
Hipofiza 525 şi u
Hipoglicemie 620
Hipooxalurie *774*
Hipotaurina *780*
Hipoxantina 183, *856*
Hipropeptide 68
Histidina **23***, **27***, *769*, *819*
— biosinteza *819 şi u.*, *821**
— catabolism *769*, *821*
Histamina 27*, 34
L-Histidinol fosfat 820
L-Histidinol 820
Histidinurie 821
Histone 32, **103***, 179
— proprietăţi 180*
— răspîndire 180*
Homocisteina 335, 347
Homocistina 37*
Homocistinuria 780
Homogentizat oxidaza 803
Homopolimeri 216, 217
Homoserina **35***, 335, *777*
Homopolizaharide 395 şi u.
Hormoni 490 şi u., 506 şi u., 522 şi u., 539 şi u., 729 şi u., 762 şi u.
— androgeni 490 şi u., **493***
— clasificare **525*** şi u.
— estrogeni 490 şi u., 494, **495***, **496***, 528*, 720
— insectelor 479, **481***, 506
— interrelaţii 530*
— factori de eliberare ai 70, 530, **532***
— forme prohormonale 531
— glicoproteici **298** şi u., **299**, **301**, **302**
— mecanisme de acţiune 522 şi u.
— pentru h. polipeptidici şi proteici 534 şi u.
— pentru h. androgeni 537 şi u.
— pentru h. estrogeni 539 şi u., 729
— polipeptidici 525 şi u.
— proteici 298 şi u., 301 şi u 525 şi u.,
Hormonul adenocorticotrop (ACTH) 83, 85 şi u., 525*
Hormonii androgeni 490 şi u.
Hormonul foliculostimulator (FSH) 291, 298, 525*
Hormonul graviditătii 490, 499
Hormonul luteotrop (LTH) 525*
Hormonul luteal (LH) 291, 298 şiu., **302***, **525***
Hormonul luteinizant 298 şi u.
Hormonul maternităţii sau gestagen 498
Hormonii cortico- şi medulosuprarenali 347 şi u., 490 şi u., 503 şi u., **527***, 534 şi u., 764 şi u.
Hormonii melanocitostimulatori 70 şi u., **87**, **88**, 526
Hormonii mineralcorticoizi 502 şi u., 528
Hormonii neurohipofizari 61, 90 şi u., 92 şi u , 526
Hormonul paratiroidian 126 şi u., **526***, 739 şi u.
Hormonii sexuali 490 şi u., **492*** şi u., **493*** şi u., **497*** şi u., 499
Hormonul somatotrop 623 şi u., 764 şi u., 886
Hormonii steroizi 489 şi u., 724 şi u.
Hormonul tiroidian 304, 624, 886
Hormonul tirotrop 291, 298 şi u., **301***, 886
Hormonii tisulari 75 şi u., 77 şi u., 79 şi u.
Hormonul β-lipotrop 128, 762
Hyla caerulea 79

I

Imidazolglicerilfosfat 820
Imidazolacetilfosfat 820
Incretina 99
Indol 34
Inductor 883
Informozom 203
Inițierea catenei polipeptidice 871 și u., **873*** și u.
Inhibitori
— ireversibili **277**
— competitivi **278*** și u.
— necompetitivi **280**
— reversibili 282 și u.
— proteici 260, 268, 270, 878 și u.
Inhibitor B o w m a n-B i r k 270
Inhibitor K a z a l 260
Inhibitor K u n i t z-N o r t h r o p 268
Inhibitor pancreatic bazic 268
Inhibitor pancreatic secretor 268
Inhibitorii sintezei proteice 878 și u.
Inhibitorul tripsinei **268***, **269***
Inozina 186, **187**, **205**, 210, *856*
Inozitol 450
Inozitolfosfolipide 450, *751* și *u.*
Inozitoltransferaza 751
Inserție 885 și u.
Insulina 67, **104***, 120, 123 și u., 142 și u., 149, *526**, *620* și *u.*
Inulina 387, **402***
Inulobioza **387***
Iodacetamida 115
Iodhemina 155
Iodopsina 746 și u.
Iodoproteina. v. tiralbumina
Ionona(e) **467**, 510
Inozitolfosfolipide 450 și u.
Invertaza 234
Ipoteza adaptorului 209 și u.
Ipoteza corespondenței nesemnificative 864 și u.
Izoaloxazina 362
Izocitric dehidrogenaza 629 și u.
Izocitraza 630
Izodesmozina 32, **33**
Izoguanina **183***
Izoinhibitori **270**, 271
Izoleucina 23*, 25*, *816*
— biosinteza *816*
— catabolism *817* și *u.*
— răspîndire 30
Izoenzime 259 și u.
Izolichenina 404
Izomaltoza 384, 385, **386***
Izomeraza 239, **244***, **246**
Izopenteniladenozina 205
Izopentilpirofosfat *717* și *u.*
Izopreni 463
Izotocina 91 și u.

K

Keratan sulfații 417
Keratina 102*, 103*
Keratomalacia 747 și u.
Kinaza fosforilazei *b* 534 și u.
Kinetina(e) 529*
Kinurenina 37, 812 și u.
K r e b s, v. ciclul lui

L

Laccaza 675
Lactalbumina 102*
Lactat dehidrogenaza 148, 238, 239, **259** și u., 286, 360, 595 și u.
Lactobacillus cazei 316, 332, 338, 454
Lactoza 385, **386***, 561
Lactozosintetaza 561
Laminaran 385, 414
Laminaribioza 386, **387**
Lanolina 443
Lanosterol 718 și u.
Lampetra fluviatilis 160, 169, 170
Legături
— de hidrogen 133 și u., 249 și u.,
— macroergice 349,
— peptidice 62 și u.
Leghemoglobina 153, 169, **170**
Leptodactylus labyrinthicus 79
Leuconostoc mesenteroides 357, 386, 398
Leucina **23***, **25***, 30, *818*
— biosinteză 818 și u.
— catabolism 818 și u.
Liaze 239, 243, 246
Lichenan 385
Lichenina 404
Ligaze (Sintetaze) 239, 243*, **247**, 351
Limitdextrine 398

Lioglicogen 401
Lipaza 234, **246**, 288
Lipide simple 425
— de rezervă 425
— citoplasmatice 425
— izoprenice 425, 473
Lipide complexe 445, 446 și u., 449 și u., 452 și u. 455 și u., 460 și u. 749 și u.
— biosinteză 749 și u., **753*** și u.,
— degradare 756 și u.
— dereglări 758 și u.
— rol în organism 760 și u., **763*** și u., 765 și u.
Lipoicamida 317
Lipoil dehidrogenaza 662
Lipoproteine 103, **304**
— α 304, 305, 721
— β 102*, 103*, 304, 305, 721
Lipotiaminpirofosfat 318
Lixoză 379
Lizina 23*, 26*, *769*, *787* și *u. 793*
— biosinteza *786* și *u.*
— catabolism *789* și *u.*, *793*, *796**
— compuși de condensare *786*
Lizin-vasopresina 91 și u.
Lizozim, v. muramidaza
Loligo vulgaris 269
Luliberina 72, 532*
Lumiflavină 362, **363**
Lumicrom 362, **363**
Leucoriboflavina **363**
Lumisterol **487***
Lutropina, v. hormonul luteinizant

M

α_2-Macroglobulina 269, 290, **296**
Magneziu 910
Malat *653 și u.*
Malat dehidrogenaza 237, 286, 633
Malonil ~ SCoA **329**, 356, *682 și u.*
Maltoza 384, 385, **386***
Maltotrioza **391**
Mangan 913
Manani **387**, 403 și u.
Manobioza **387**
Manitol 602
Manoza 289, 290, 380, **381**
Manolipide 575
Mecanisme
— aleatorii 276
— Bi-Bi 276
— ordonate 276
— secvențiale 276
Mecanismul fosforilării oxidative 671
— teoria chimică 671
— teoria chemiosmotică 672
— teoria conformațională 673
Medicago sativa 570
Melanine *808 și u.*
— biosinteză *810 și u.*
— rol în celulă 810 și u.
— structură 810
Melanoliberina **70**, 532*
Melanostatina **70**, 532*
Melatonina 528*
Melanuria *812*
Melibioza 386
Melicitoza **392**
Mercaptoetanol 251
Mesocricetus auratus 71
Metaloenzime 150, **309***
Metaloproteine 103, **307** și u.
Metale, în sisteme biologice 309 și u., 313 și u., 906 și u., 913 și u., 916
Methemoglobina 162
α-Metilbutiril ~ SCoA 817
β-Metilcrotonil ~ SCoA 331
β-Metilcrotonil ~ CoA cocarboxilaza 330
Metilcitozina **184***, 220, *857*
β-Metilglutaconil ~ SCoA 331
Metilguanina 210
Metilhistidina 27*, 28*
Metilmalonil ~ SCoA 331, *705* și *u.*
Metilmalonil oxalilacetic transcarboxilaza 330, 331
Metilmalonil ~ SCoA 331
Metiltioizopenteniladenozina 205
Metionina 23*, 25*, 29, 30, 187, 347, *777*
— biosinteza 347
— catabolism 351, 777
Metionin racemaza 335
Mezoporfirina 372
Mezotocina 91 și u.
Microzomi 678, 689
Mioglobina 102*, 103*, 130, 141, 153, *163*, 174
Mioinozitol 616
Mimozina 37*

Miozina 102*, 103*
Mitocondria 215, 216, 626, 652, 689
— creste mitocondriale 652
— dimensiuni 652 și u.
— rol în ciclul Krebs 626 și u.
— în catena respiratorie 652 și u.
— în biosinteza și oxidarea acizilor grași *689* și *u.*, *694* și *u.*, *701* și *u.*
— structura schematică 652
— structura electronomicroscopică 652
Modelul straturilor pliate 136
Modelul structural al colagenului 137 și u.
Modulator 283
— allosteric 283
— pozitiv 283
— negativ 283
Monoaminooxidaze 770
Monozaharide 377 și u.
— biosinteză *546* și *u.*, *552* și *u.*, 555 și u.
— proprietăți 377 și u., **379***
— structură 377 și u., **379***, **381***, **382***
— răspîndire 377 și u.
— rol în metabolism *584* și *u.*
Monoiodtirozina 37*
Mononucleotide 180
Monoterpene 465 și u.
Mucopolizaharide 414 și u., 459
Mucoproteine 289, 459
Mucilagii 409, 410
Mucine 103*, 289
Muramidaza 113* **129**, 257, 561
Mutații genetice 885 și u.
Mycobacterium phlei 230, 231, 331, 368*, 451, 453, 731
Mycoplasma arginini 220
Mya arenaria 292, 405

N

Naja naja 92, 268
Naja nivea 268
Nebularina 187, 188
Neovitamina A 746
Neuramin lactoza 393
Neurospora crassa 237, 327, 357, 368*, 815
Niacina 812 și u., 876 și u.
Niacinamidadenindinucleotid NAD^+ 185, 357 și u., 521, 626 și u., 653 și u., 657 și u., 667 și u., 876
Niacinamidadenindinucleotid fosforilat $NADP^+$ 185, **357** și u., 653 și u., 656
— în catena respiratorie *652* și *u.*
— în ciclul Krebs *625* și *u.*, *634* și *u.*, *636* și *u.*
— în fosforilarea oxidativă *652* și *u.*, *656* și *u.*
— în reacții de reducere și oxidare 358
— stereospecificitate 358 și u., **359*** și u.
— structură 358
— în calea fosfogluconatului *608* și *u.*, *612* și *u.*
— în fotosinteză 558, *632* și *u.*, *668* și *u.*
Nicotinamida 347
Nicotinat ribonucleotid 350
Ninhidrina 52 și u
Nitrotirozina 115
Nonuloze **383**, **384**
Noradrenalina 347, **527***, 534 și u., 746 și u.
Norleucina 25*
Norvalina **25***, 30
Nivel(e) de organizare 121 și u. 131 și u. 138 și u. 141 și u., 144 și u.
Norprogesteron 498
19-Nortestosteronfenilpropionat **494***
17-Etil-19-Nortestosteron **494***
Nucleocidina 187, 188
Nucleoproteine 103, 179
Nucleozide 180, **185*** și u., 348 și u.,
Nucleotide 179, 190 și u.

O

Ocitocina 61, 90, **91** și u., 526
Octopina 26*, 32
Octopamina 809
Octoze **383** și u.
Oligoglucide vezi oligozaharide
Oligonucleotide 180
Oligonucleotidaze 854
Oligopeptide 62
Oligozaharide 384 și u.
Operon 882 și u., 885 și u.
Opsina 746 și u.
Ornitina 33, **36***, 822 și u.
— biosinteza *769*, *787*, *822* și *u.*
— metabolism *793*, *796**, *822* și *u.*
— în formarea ureii *822* și *u.*
— în metabolismul argininei *793*

Ornitincarbamil transferaza 823
Ornitin decarboxilaza 793
Orosomucoid 103*
Ornitin transcarbamilaza 883
Orotidin-5′-fosfat 833
Osteomalacia 739 şi u.
Osteoporoza 739 şi u.
Ovalbumină 102*, 103*, 113, 291, 306
Ovoinhibitor 271
Ovomucina 291
Ovomucoid 271, 291
Ovotransferina 103*
Oxalilacetat 356, *653 şi u.*
Oxalurie *619 şi u.*
Oxidare biologică 648 şi u., 674 şi u.
Oxidoreducere 69
— biologică 649 şi u.
— potenţiale redox 650 şi u.
— sisteme redox *651** şi u., 658
Oxidaze 674 şi u., 676 şi u.
Oxidaze terminale directe 674 şi u.,
Oxidoreductaze 239, 240, 241*
Oxibiotina 327
Oxihemoglobina 160 şi u.
Oxigenaze 677 şi u., 689 şi u.
Oximetilcitozina 220
Oxinervona 456
Oxiprolina 23*

P

Paleogenetică chimică 160
Panoza 393
Pancreozimina 527*
Panteteina 534
Papaina 119, 239, 287, 766
Parapolifenoloxidaza 675
Parathormon v. hormon paratiroidian
Pectine 408 şi u., 574 şi u., 576*
Pectinaze 408 şi u.
Pelagra 361
Penicillium 385
Pentozani 402* şi u.
Pentoze 379 şi u., 380*
Pentozurie 619, 771
Peonina 423
Pepsina 102*, 119, 234, 259, 261, 262, 287
Pepsinogen 261, 262
Peptidaze *887*
Peptide 61
— biosinteza *858* şi u.
— acţiunea antibiotică 94 şi u., 95*, 96*, 97*
— acţiune hormonală 70 şi u., 73 şi u. 75 şi u., 77 şi u. 80 şi u., 83 şi u. 88*, 90, 91*, 98 şi u.
— acţiune toxică 93*,
— ciclice 90 şi u., 93 şi u., 95 şi u., 97
— liniare 71
— naturale 67, 71, 122
— nomenclatură 67
— sintetice 61, 62 şi u.
Peptida *C* a insulinei 124 şi u.
Peptida care inhibă secreţia gastrică (GIP) 81
Peptida intestinală vasoactivă (VIP) 82
Peptida pancreatică bovină (BPP) 82
Peptida pancreatică la păsări 83
Peptidiltransferaza 875 şi u.
Peptidilpuromicina 878
Peptidoglicani 290
Peroxidaza 103*, 153, 174*, 240, *674*
Peroxidaza acizilor graşi 707
Peroxizomi 676
Pigmenţi accesorii 546 şi u.
Pigmenţi melanici 34
*p*H izoelectric 44
*p*H optim de acţiune 281
Phascolosoma gouldii 308
Phaseolus vulgaris 173, 270, 470
Pheophyceae 165
Phycomyces blakeslee 327
Phyllomedusa bicolor 73, 74
Physalaemus fuscumaculatus 74
Piridoxal 332
Piridoxal fosfat 259, 333
— coenzima 259, 333 şi u.
— structură 333
Piridoxamina 332
Piridoxina 332
Piridoxamin-5′-fosfat 333 şi u.
Pirimidina 181
Pirofosfataza 862 şi u.
Pirofosfokinaza 350

Piruvat carboxilaza 321, **640***
Piruvat dehidrogenaza 626 și u.
Plasmalogeni 448, **449***, 749 și u.
Plasmide 220
Plastide 220
Plastina 164
Plastochinona 520, 547, *803*
Planteoza 390
Poliaminoacizi 65
Polidipsie 92
Polifenoloxidaza 675
Polifructozani 402
Poliglutamil peptide 93
Polimixina(e) 21
Polimeraza DNA 840 și u., 842 și u., 845
Polimeraza RNA 847 și u., 849 și u., 851 și u.
Polinucleotide 179, 180
Polinucleotid fosforilaza 201, 867 și u.
Polipeptide 62
— biosinteză 94 și u.
— ciclice 94 și u.
— liniare 71 și u.
— monotone 65
— naturale 71 și u., 90 și u.
— proprietăți 71 și u.
— răspîndire 71 și u.
— structură primară 71 și u.
Polimeraza 871
Polinevrite 321 și u.
Polinucleotid fosforilaza 853
Poliprolina în helixul colagenului 137 și u.
Poliribonucleotide 179 și u.
Polideoxoribonucleotide 179 și u.
Poliprenoli 471 și u.
Poliribozomi 879 și u., 881 și u.
Politerpene 507 și u.
Poliurie 92 și u.
Polizomi, v. Poliribozomi
Polizaharide cu sulf 417
Polizaharuri 394 și u.,
Polizaharide 394 și u., 561 și u., 567
Polizaharide bacteriene 413 și u.
Porfiria ereditară 890
Porfirine 168, 174
Porfiropsina 746 și u.
Porfobilinogen 888
Porfobilinogen dezaminaza 888
Potențial reducător 650
Potențial de membrană 653 și u., 672 și u.
Potențial electrochimic 671
Potențial al grupărilor de transfer
— redox 650 și u.,
— în reacții biologice de oxidoreducere 650 și u., **651***, **656***, **662***
Precalciferol 484
Preenzime 261 și u., 264 și u., 266 și u.
Pregnan 727
Pregnenolon **726*** și u., 729, 730 și u.
Premelanozomi 808
Presinamida 70
Proangiotensina 76
Procalcitonina 90
Procarboxipeptidaza 267
Proenzime v. preenzime
Proflavina **843***
Progesteron 498 și u., 528*, 726* și u., 729, 730 și u.
Prohormoni 90, 124
Proinsulina 124 și u.
Prolactoliberina 74, 532*
Prolactostatina 74, 532*
Prolina 23*, 28*
Prolil-hidroxiprolina 68
Prolidaza 119, 120
Pronaza 119, 269
Proparathormon 127
Propionil ~ SCoA 331, 704 și u., 816 și u., 817
Propionil ~ SCoA carboxilaza 330, 331, 704 și u.
Prostaglandine 440 și u., **529***, *710* și u., *714** și u.
Protamine 32, 103*, 179, 180*
Proteină purtătoare de acil (ACP ~ SH) **684*** și u., 717 și u.
Proteine 101 și u.
absorbția rezonantă 151 și u.
— adsorbție pe geluri 108
— agregarea subunităților 113 și u.
— biosinteza 858 și u.
— capsidei 871
— catene polipeptidice 123 și u., 135 și u.
— clasificare 102*, 103*
— complexe 103* și u., 153 și u., 179 și u., 233 și u., 289 și u.
— compoziție în aminoacizi 109 și u.
— conformație 121, 145
— criterii de puritate 108 și u.

— cromatografie 107, 108
— determinarea masei moleculare 110, 111 și u.
— dicroism în infraroșu 146 și u.
— difracție de raze *X* 113, 122, 131
— dispersie optică rotatorie 146 și u.
— electroforeză 107
— fibrilare 139
— globulare 139
— grupări ionizabile 138
— filtrare pe geluri 108
— forțe de stabilizare 122 și u., 131 și u., 134 și u., **135***, 138 și u., **140***, 143
— fracționare cu săruri și solvenți 105 și u.
— funcții biologice **102***
— hidroliza 110, 114
— acidă 114, 115 și u.
— enzimatică specifică 119
— enzimatică nespecifică 118
— cu enzime insolubilizate 120
— secvențială 116 și u.
— hidroliza parțială 115 și u., 118 și u.
— hidrazinoliza 117 și u.
— hidroliza cu bromcian 115 și u.
— izolare și purificare 105 și u.
— legături specifice 122 și u., **140***, 146 și u.
— masă moleculară, determinare **104***, 110 și u., 113 și u.
— metabolism *887* și *u.*, *890* și *u.*
— metode de analiză 146 și u.
— nucleoproteine 179 și u.
— oligomere 123, 143, 257
— polaritatea procesului de biosinteză 884
— procese postbiosintetice 880 și u.
— protomeri în proteine și enzime 123, 683 și u.
— precipitarea ireversibilă 105 și u.
— precipitarea reversibilă 105 și u.
— protomer 144, 257
— purificare 105 și u.
— putere rotatorie optică 146 și u.
— reglarea biosintezei *881* și *u.*, *886* și *u.*
— relații cu acizii nucleici **103***, 179 și u.
— relații cu grupările prostetice 157 și u, 163
— rezonanță magnetică nucleară 148 și u.
— rezonanță magnetică a protonului 149 și u.
— rezonanță electronică de spin 150 și u.
— rol catalitic 101
— rol energetic 101
— rol plastic 101
— rol structural 101, **102***
— separare, purificare, caracterizare 105 și u.
— scindarea cu bromcian 115 și u.
— scindarea cu iodacetamidă 115 și u.
— simple **103***, **125***, și u., **127**, **128**, **129**, 130 și u.
— sinteza *858*
— în sisteme acelulare *860*, *871* și *u.*, *874* și *u.*, *877* și *u.*
— control genetic *879*, *881* și u.
— reglare *882* și *u.*, *885* și *u.*
— solubilitate 109
— spectroscopie în *IR* 146 și u.
— spectroscopie *RES* 150 și u.
— structura primară 122 și u., 128 și u., 155, 156
— structura secundară 131 și u., 256 și u.
— structura terțiară 138 și u., 144, 156, 257 și u., *864 și u.*
— structura cuaternară 141 și u., 144 și u., 258 și u.
— structură random coil 122 și u., 144 și u.
— subunități 144, 257, 683
— sulfotioliză 118
— verificarea purității 108
Proteoglicani 290
Protomeri 144, 257
Protoporfirină 153, 154, 173, 371, *678*, *888* și *u.*
Protopterus annectens 92
Protopterus dolloi 92
Provitamina *A* 509 și u., **510***, **511***
Provitamina *D* 484 și u., **485*** și u.
Pseudoblastidona 189
Pseudouridina 204, 205 și u., 210
Pseudomonas citromellolis 331
Psicofuranina 187, 188, **848***
Psihozina 457, *754* și *u.*
Pteridina 339
Pteroilenzime 345
Ptomaine 32, *769*
Purina(e) 181
Puromicina 187, **188**, *878* și *u.*
Puterea rotatorie optică 146
Putresceina *769*, *793*, **796***

R

Racemaze 246
Rafinoză 392, 393
Rahitism 740
Raia batis 92
Raia clavata 92
Raia fullonica 92
Raia naevus 92
Ramnoza 381
Raport de colinearitate 871
Reactiv Edman 54 și u.
Reactivi de grup 250
Reactiv Sanger 54 și u.
Regiune intercistronică *871*
Relaxina 527*
Renina 75, 76
Rennina 288
Reovirus tip 3 : 199
Replicare conservativă *838* și *u.*
Replicare dispersă *838* și *u.*
Replicare semiconservativă *838* și *u.*
Replicaze ale *DNA.* 840 și u.
Replicaze ale *RNA.* 847 și u.
Replicator 840
Replicon 840
Represie 882
Represor citoplasmatic 882
Represori ai sintezei 882 și u., 884 și u.
Respirație celulară, v. catena de respirație
Reticulina 291
Retinol 512, 513 și u., *744* și *u.*
Retinal 513, *746* și *u.*
Retinen 746 și u.,
— *cis-Retinen* 747*
— *trans*-Retinen 747*
Retinen reductaza 747
Rezervă alcalină 710
Rhodochorton rothii 165
Rhodophyceae 165
Ribitol 362 și u.
Riboflavin-5'-fosfat 259
Ribonucleaza (E7) 67, 129, 144, 199, 236, 259
— centru activ 259
— proprietăți 259
— structură 259
Ribonucleoproteide 103*
Ribonucleotide 190, 193
Ribonucleotid reductaza 151
Ribonucleozide 185* și u, 187* și u.
Riboză 180, 379
Riboziltimina 204
Ribozo-1-fosfat 379
Ribozo-5-fosfat 350, 353 și u, *829**
Ribozo-3'-fosfat 354
Ribozomi 865 și u.
— agregare cu formare de polizomi 872 și u.
— coeficient de sedimentare 860 și u.
— complexe cu aminoacil RNA 872 și u.
— compoziție 860
— dimensiuni 860, 872 și u.
— formă 860, 873* și u., 877 și u.
— legare de *m*RNA 872 și u.
— ribozomii eucariotelor 860
— ribozomii procariotelor 860
— stare de agregare 861 și u., 872 și u.
Ribuloză 379, 380
Ribulozo-1,5-difosfat 552 și u., 555 și u. 609 și u., *820*, *828*
Ribulozo-5-fosfat 553 și u., 609, 610
Ribulozo-5-fosfat epimaraza 609
Ricinus communis 173
Rifamicina 848*, 878 și u.
Rifampicina 878 și u.
RNA, v. acizi ribonucleici
RNA polimeraza 847 și u.
Rodoflavina 366
Rodopsina 746 și u.
Rotație optică 147
Rotenona 667* și u.
Rubredoxina(e) 311

S

Saccharomyces cerevisiae 368
Salicina 420
Saponificare 434
Sarcozina 23, 348
Săpunuri 438
Săruri biliare 906
Scatol 102*
Schwartz, factorul lui 766
Scleroproteine 103*
Scorbut 320
Scvalen *717* și *u.*
Secretina 77, 527*
— rol biologic 78
— structură 77

Sedoheptuloza **382**
Sedoheptulozo-1,7-difosfat **553*** și u.
Sedoheptulozo-6-fosfat **553*** și u.
Sedoheptulozo-7-fosfat *553** și u., *611* și *u.*, 613 și u.
Semialdehida malonică *775*
Semichinona 367
Semiterpene 464
Sephadex, preparate de 59 și u., 60*
Sephadex-uri 400
Serii *D* și *L* 21, 377
Serina 23*, 24*, 29, 45, 775
— biosinteză 348, *775* și *u.*
— deaminare 335
— în centrul activ al enzimelor **255*** și u.
— în metabolismul etanolaminei și serinei 749 și u, 751, 753
— în fosfolipide 448 și u., 749 și u., 751 și u.
— în formarea glicocolului 346
— transaminare 335
Serindehidraza 334, 336
Serinenzime **255*** și u.
Serin transhidroximetilaza 772
Serinfosfolipide *448*
Serotonina *813*
Serumalbumine, v. și albumine serice 104*, 113*
Sesanum indicum 173
Sesquiterpene 467 și u.
Sfinganina 449, 456, *752*
Sfingenina 449, 456, *752* și *u.*
Sfingolipide *758* și *u.*
Sfingofosfolipide 449, *752* și *u.*
Sfingomielină *754* și *u.* *757* și *u.*
Sfingozina 450, 456, 460
Siderocromi 308
Siderofilina, v. transferine
Sinefrina *809*
Sintetaza, acizilor grași 685, **686*** și u., 717 și u.
Siphonosoma ingens 308
Sipunculus nudus 308
Sinteză în fază solidă 65 și u.
Situs catalitic activ, v. centru activ 248 și u., 255*, 259, 260
Situs reglator sau allosteric 284
Solanină 423
Somatotropina 100
Somatoliberina 71 și u., 532*
Somatomedina 100
Somatostatina 71, 532*
Sorboza 380, **381**
Specificitate 160 și u., 237 și u.
— de acțiune a enzimelor 237
— absolută de substrat 237, 238
— absolută de grup 237, 238
— de reacție 237
— de specie 160
— relativă de grup 238,
— stereospecificitate 239
Specificitatea *t*RNA 863 și u.
Spectroscopie în *IR* 146 și u.
Spermanțet 443
Spermidina 179, 180*, *794* și *u.*
Spermina 179, 180*, *794* și *u.*
Stahioză 394
Staphilococcus aures 94, 95, 231, 357
Stercobilinogen 891
Stercobilina 891
Stereospecificitate 239
Steroizi 463, *473** și *u.*
— animali 477, **478***, **479***, **481***, 485*, 489 și u.
— biosinteză 716 **717**, **718***
— conformație 475
— catabolism **722***, **723**, 724 și u. **726***, **730***,
— izomerie 476
— răspîndire 473 și u. 477, 480
— rol 482, 484, 489
— structură 474 și u.
Steroli 477 și u.
— animali 477, 478
— biosinteza **717*** și u.
— catabolism **482*** **483***
— fitosteroli, v. vegetali
— în formarea acizilor biliari 482
— răspîndire 480
— structură **478***, 479
— vegetali 478, 479, 481
— zoosteroli, 479, 481
Stigmasterol 736
Streptococcus lactis 316, 318
Streptococcus sp. 188, 189
Streptomicina 36, 878 și u.
Streptolina 36

Streptomycine fulvissimus 97
Substanţe pectice 406 şi u.
Substanţa *P* 74, 75
Substituiri alternante 159
Substituiri conservatoare 159
Substratul reacţiilor enzimatice 249, 256, 272
Substrat al respiraţiei celulare 652 şi u.
Subtilizina 119, 269
Subtilopeptidaza 119
Subunităţi
— catalitice 248 şi u.
— enzimatice 250
— regulatorii 534 şi u.
Succinat : CoA ligaza (ADP) 631
Succinat dehidrogenaza 103*, 367, **632**, *662**
Succinil ~ SCoA 371, *630* şi *u.*, *698* şi *u.*, *703* şi *u.*, *816*
Succinil tiokinaza 631 şi u.
Sulfanilamida 831
Sulfatidoze *760*
Sulfobacterii *558*
Sulfolipide 460 şi u.
Sulfonolipide 460
Sulf 911
Superhelix 137 şi u.
Suprasterol *737* şi *u.*

T

Tahisterol **487***, *737*
Talasemia 158
Talasemia majoră 158
Talasemia minoră 158
Taurina 25*, **36***, *724*, *780*
Teanina 36*
Temperatură
— coeficient de degajare 280
— influenţa asupra enzimelor 281, 281*
— optimă de acţiune 280 şi u.
Teoria Brönsted 40
Teobromina 181
Teofilina 181
Terminarea catenei polipeptidice *877* şi *u.*
Terramicina 878 şi u.
Termolizina 269
Terpene 464 şi u.
Testosteron 412, 493, 528*, *726*
Tetanie 320, 322
Tetrahidrofolaţi *872* şi *u.*
Tetrahymena galeii 316
Tetrahymena pyriformis 173
Tetraiodtironine 37
Tetrazaharide 393 şi u.
Tetraterpene 471
Tiamina 321
— activitate de coenzimă 322 şi *u.*
— carenţă 321
— funcţii 323 şi u.
— intervenţie în
— metabolismul alcoolilor 325
— metabolismul glucidelor 323 şi u.
Tiamin pirofosfat, TPP 322
Timidina 835
Timidilat sintetaza 836
Timina 184*, *857*
— biosinteză *857*
— baze perechi 225
— catabolism 856
— degradare 857 şi u.
— structură **184***
Tioaminoacizi **25*** 29, **37***
Tiocrom 322
Tiogalactozid transacetilaza 884
Tioetanolamina 354, *684*
Tiokinaza 710
Tioliza 701
Tioredoxina 151, *835*
Tiouracil 185
Tiouree 142
Tiouridina 204, **205**
Tiralbumina 304
Tiramina 27*, 34
Tirocidine 94, 95

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tiroida *739*
Tirotropina **525***
Tiroliberina 532*
Tirocalcitonina, v. Calcitonina
Tirocidina 34
Tiroglobulina 291, **303**
Tiroxina 34, **37***, 527*
Tirozin decarboxilaza 334
Tirozina 23*, 27*, 34, *769*, *804**, *805* şi *u.*, *806**, *807** şi u. *809* şi u.
Tirozin oxidaza 103*
Tirozinemie *810* şi *u.*
Tirozilurie *810* şi *u.*
Tirozinoza *810* şi *u.*
Tocinamida 70
Tocol 515
Tocoferoli 514 şi u.
Tocotrienoli 515
Toluen sulfonil-L-fenilalanil-clorometilcetona (TPCK) **253**
Toluen sulfonil-L-lizin-clorometilcetona (TLCK) **253**
Tomatina 422
Transaldolaza 611
Transaminaze 336 şi u.
Transcetolaze 325
Transcortina 725
Transcripţie 866
Transcriptaza 867
Transcripţie asimetrică 866, 884
Transducţie 885
Transfer de sarcină 250
Transferaze 239, **240**, 242*
Transferina, v. şi Siderofiline 152, 290, 291, **293** şi u., *888*
Transformilaze 344 şi u., 346 şi u.
Transglicolizare 562 şi u.
Translaţie 866
Translocaza *876*
Trehaloza 390, **391**, *561*
Treonina 23*, 25*, 47, *817*
— biosinteza *817*
— catabolism *817* şi *u.*
— răspîndire 30
— rol 30
Triacantina 204, **205**
Triacilgliceroli 246, 305, 438, *765* şi *u.*
— acumulare 439 şi u.
— biosinteză *714* şi *u.*
— hidroliză *714* şi *u.*, 765 şi u.
— importanţă 305
Tribomma bombycinum 165
Trichoderma viridae 97, 406
Trifosfoinozitide 451
Trigliceride, v. Triacilgliceroli
Triiodtironina 37, 527*
Trinucleotide 867
Trioze 377, **378**
Triozofosfat izomeraza 589 şi u.
Tripsina 76, 102*, 119, 234, 239, 255*, 259, 262, 263, 270, 287, 766
Tripsinogen **262**, **264**
Triptamina **27***, 34, *814*
Triptofan **23***, 34, *812* şi *u.*
— biosinteza *336*
— catabolism *812* şi *u.*, *814*
— formare din 813, **814***
— metabolism *336*, *812* şi *u.*
— structură 27
— transaminare 814
Triptofanaza 336
Triptofanurie *813*
Triptofan pirolaza 812
Triptofan sintaza 336, 803
Trizaharide **391** şi u.
Trombina 102
Tropocolagen 138
Turanoza 392

U

Ubichinona 520, 656 şi u., 665 şi u., *803*, **806***
— funcţii 656 şi u., 661 şi u., 667 şi u.
— răspîndire **520**, 661 şi u.
— structură **520**, 661 şi u., 806*
UDP, v. acid uridin-5′-difosforic

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

UMP, v. acid uridin-5′-monofosforic
UTP, v. acid uridin-5′-trifosforic
UDP-acid glucuronic 195* și u.
UDP-acetilgalactozamina 197*
UDP-acetilglucozamina 196*
UDP-galactoză (UDP Gal) 195*, 352, 559
UDP-glucoză (UDP Glc) 195*, 352, *559*, *615*
UDP-glucozamina 195*
UDP-*N*-acetilglucozaminfosfat 196*
UDP-transglucuronilaza 559
UDP-transglucozilaza 561
Undecaprenoli *578* și *u.*
Unitate a perioadei de evoluție 176
Universalitatea codului genetic 869 și u.
Uracil 181, 183*, *774*, *857*
Urat oxidaza 857
Uree *822* și *u.*, *824*
Ureidosuccinat *831*
Ureaza 237
Uricaza 856
Uridina 185
Urogastrona 98
Urobilin *891*
Urobilinogen *891*
Uroporfirina *888* și *u.*
Uroporfirinogen *888* și *u.*
Urovillikinina 98
Utter, ciclul lui 568

V

Valina 23*, 25*, 30, *815*
— biosinteza *815* și *u.*
— catabolism *815* și *u.*
— transaminare 815, 816
D-Valina 21
Valinomicina 96, 97
— răspîndire 96, 97
— rol 96, 97
— structură 97*
Vant Hoff, legea lui 280
Vasopresina 61, 90 și u., 91 și u., 525
Vasotocina 91 și u.
Verbenonă 466
Verdoflavină 366
Verdohemocrom *890*
Vipera aspis 92
Villikinina 98
Viomicina 36
Virusul mozaicului tutunului (*VMT*) 199
Virusul poliomielitei 199*
Virusul galben al turnepsului 199*
Vitamina *A*, v. Retinol
Vitamina B_1, v. Tiamina
Vitamina B_2, v. Riboflavina
Vitamina B_6, v. Piridoxina
Vitamina B_{12}, v. Ciancobalamina
Vitamina B_{15}, v. Acid pangamic
Vitamina *C*, v. Acid ascorbic
Vitamina D_3, v. Colecalciferoli
Vitamina D_2 v. Ergocalciferol
Vitamina *E*, v. Tocoferoli
Vitamina *K*, v. Filochinone
Vitamina *PP*, v. Niacinamida
Vitelina 103*, 306
Vitelenina 103*, 306

W

Walrat 443

X

Xantina 182*, *856*
Xantin oxidaza 311, 367, 662*
Xantozina 186, 187
Xantofile 164

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Xenopus leavis 79, 222
Xeroftalmie 747 și u.
Xilani 402, 403
Xilobioza 388
Xiloza 377 și u.
Xiluloza 379, **380**, *617* și *u.*
Xilulozo-5-fosfat **553***, *610* și *u.*, 618

Z

Zaharaza 561
Zaharide **377** și u.
Zaharoză 352, 390, **391**, 560 și u.
Zaharozo-6-fosfat 561
Zaharozofosfat sintetaza 560 și u.
Zaharozofosforilaza, v. Fosforilaza zaharozei
Zeina 32, **102***
Zimogene 261, 263 și u., 267
Zimosterol 718 și u.
Zinc 912 și u.
Zoosteroli 477 478, 481

BCU IAȘI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BIBL. CENTRALĂ UNIVERSITARĂ
[illegible]
334/1980 24cm Lei 42,10

Plan editură Nr. 5806
Coli de tipar 61,50
Bun de tipar 18 XI 1980

c. 636. I. P. „Informația"
Str. Brezoianu 23—25 București

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Lei 42,10

BCU - SVICENTRAL - UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA